

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Marie Ksandrová

Role proteinu cFLIP/CFLAR v aktivaci a regulaci buněčné smrti

Role of cFLIP/CFLAR protein in the activation and regulation of cell death

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Marie Ksandrová

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc. za připomínky, rady a čas, který mi věnoval. Dále také děkuji všem, kteří mě při psaní práce podporovali.

Obsah

Abstrakt:	6
Abstract:	7
Seznam zkratk:	8
Úvod:	11
1) Apoptóza:	11
<i>Vnější dráha apoptózy:</i>	<i>12</i>
– Receptory smrti	12
– Signalizace z receptorů Fas/CD95, TRAIL-R1 a TRAIL-R2	12
– Kaspázy	12
– Signalizace z receptoru TNFR1	13
<i>Vnitřní dráha apoptózy:</i>	<i>14</i>
– Bcl-2 proteiny	15
– Aktivace permeabilizace vnější mitochondriální membrány a vzniku apoptozomu	15
<i>Exekuční fáze:</i>	<i>16</i>
2) Nekróza a nekroptóza:	16
<i>Nekrozom:</i>	<i>16</i>
3) Objev proteinu c-FLIP:	18
4) Gen c-FLIP:	19
<i>Lidský c-FLIP:</i>	<i>19</i>
<i>c-FLIP u savců a dalších obratlovců:</i>	<i>20</i>
5) Regulace exprese a množství proteinu c-FLIP:	22
<i>Regulace transkripce:</i>	<i>22</i>
<i>Regulace sestřihu a vzniku různých izoform proteinu c-FLIP:</i>	<i>23</i>
<i>Regulace translace:</i>	<i>24</i>
<i>Posttranslační modifikace, stabilita a degradace proteinu c-FLIP:</i>	<i>24</i>
– Nitrosylace	24
– Fosforylace	25

– Ubiquitinace	26
6) Struktura proteinu c-FLIP:	27
7) Funkce proteinu c-FLIP v apoptóze:	28
<i>Interakce s proteinem FADD:</i>	<i>29</i>
<i>Interakce s kaspázou 8:</i>	<i>30</i>
<i>Štěpení proteinu c-FLIP_L v komplexu DISC:</i>	<i>30</i>
<i>Proapoptotická funkce c-FLIP_L:</i>	<i>31</i>
<i>Antiapoptotická funkce c-FLIP_L:</i>	<i>32</i>
<i>Regulace funkce c-FLIP_L:</i>	<i>32</i>
<i>Antiapoptotická funkce c-FLIP_S a c-FLIP_R:</i>	<i>33</i>
8) Funkce proteinu c-FLIP v nekroptóze:	34
<i>Nekroptóza indukovaná ligandy TNF a FasL:</i>	<i>34</i>
<i>Ripoptozom:</i>	<i>35</i>
9) Další funkce proteinu c-FLIP:	37
10) Klinický význam proteinu c-FLIP a jeho potenciální využití v léčbě rakoviny:.....	37
Závěr:	38
Seznam použité literatury:	39

Abstrakt:

Programovaná buněčná smrt je přirozený mechanismus, který jak během embryogeneze, tak i homeostáze organismu slouží k odstranění poškozených, nepotřebných nebo nebezpečných buněk. Jedná se o nevratný proces, který musí být striktně regulován. Defekty v regulaci buněčné smrti vedou k závažným onemocněním. Také z těchto důvodů jsou mechanismy rozhodující mezi přežíváním a smrtí buněk předmětem intenzivního výzkumu. Jedním z proteinů podílejících se na regulaci programované buněčné smrti je c-FLIP. Tento regulátor se v lidském organismu nachází ve třech izoformách (dlouhá izoforma c-FLIP_L a dvě kratší varianty c-FLIP_S a c-FLIP_R) a majoritním interagujícím proteinem je prokaspáza 8. O důsledku jejich funkční interakce (inhibice či aktivace autoproteolytického štěpení prokaspázy 8) rozhoduje množství proteinu c-FLIP, zastoupení jednotlivých izoform a extracelulární podněty. Jelikož je c-FLIP důležitou součástí signálních drah různých typů buněčné smrti (apoptózy i regulované nekrózy), jsou jeho expresní a funkční modifikace striktně regulovány mnoha mechanismy. Zvýšená exprese proteinu c-FLIP je pak spojena s mnohými nádorovými onemocněními a jejich rezistencí vůči používané terapii.

Klíčová slova: signalizace, apoptóza, nekroptóza, kaspáza 8, c-FLIP

Abstract:

Programmed cell death as a natural mechanism plays essential role in development and homeostasis maintenance through removal of damaged, unwanted or dangerous cells. The cell death is an irreversible process must be strictly regulated and thus defects in the regulation of cell death could lead to serious/fatal diseases. There are also one of the reasons why cell death regulating mechanisms are subjects of intense research nowadays. c-FLIP is one of several important cell death regulators. Three distinct isoforms of c-FLIP were detected on the protein level in human organism (long c-FLIP_L and two shorter variants c-FLIP_S and c-FLIP_R) that interact their main cellular partner procaspase 8. The functional consequences of their interaction (enhancement or suppression of procaspase 8 selfprocessing) depend on the cellular level of c-FLIP, expressed splice variants and extracellular signaling. As c-FLIP is an important component of cell death signaling pathways (apoptosis and regulated necrosis), its expression and functional posttranslational modifications are strictly regulated by several mechanisms. Upregulation of c-FLIP levels has been found in various types of tumor cells that are often resistant to anticancer treatment.

Klíčová slova: signaling, apoptosis, necroptosis, caspase 8, c-FLIP

Seznam zkratek:

AP-1	Activator protein-1
AR	androgen receptor
Atg3	autophagy related gene 3
BAD	Bcl-2 associated agonist of cell death
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
BH3	Bcl-2 homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death
CAD	caspase-activated DNase
CaMK II	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CARD	caspase activation and recruitment domain
CASH	caspase homolog
Casper	Caspase-eight-related protein
ced	cell death protein
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
c-FLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
cIAP	cytosolic IAP
CLARP	caspase-like apoptosis regulatory protein
CLD	caspase like domain
CREB	cAMP response element-binding protein
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
DR	death receptor
dsRNA	double stranded RNA
EGR1	early growth response-1

eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	extracellular-signal regulated kinase
Er β	estrogen receptor β
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
FLAME	FADD-like antiapoptotic molecule
FLICE	FADD-like interleukin-1- β -converting enzyme
Foxo3a	forkhead box O3
GCDCA	glycochenodeoxycholic acid
hnRNP K	heterogenous nuclear ribonucleoprotein K
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAD	inhibitor of CAD
I-FLICE	inhibitor of FLICE
IL-1	interleukin 1
IRF5	interferon regulatory factor-5
JNK	c-Jun N-terminal protein kinase
kbp	kilobasepair
LC3	light chain 3
LPS	lipopolysaccharide
MCL-1	myeloid cell leukemia 1
MDa	megadalton
miRNA	microRNA
MLKL	mixed lineage kinase like protein
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MRIT	MACH-related inducer of toxicity
mRNA	messenger RNA
NFATc2	nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
NO	nitric oxide
Par-4	prostate apoptosis response factor-4
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase

PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PKC	protein kinase C
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIPK	receptor interacting protein kinase
ROS	reactive oxygen species
SMAC/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI
SNP	single nucleotide polymorphism
tBid	truncated Bid
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	tumor necrosis factor receptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor associated death-domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
UTR	untranslated region
v-FLIP	viral FLIP
XIAP	X-linked IAP

Úvod:

Cílem této práce je objasnit roli proteinu c-FLIP v regulaci buněčné smrti, především apoptózy a nekroptózy. Práce by měla podat ucelený přehled o úloze proteinu c-FLIP v programované buněčné smrti, o důsledcích jeho interakce s kaspázou 8 i o procesech regulujících množství a funkci tohoto proteinu v buňce.

1) Apoptóza:

Pojem „buněčná smrt“ poprvé zmínil německý vědec Carl Vogt ve své práci v roce 1842 (shrnutí v (Clarke and Clarke, 2012)). Název "Apoptóza" však pro regulovanou buněčnou smrt poprvé použili Kerr, Wyllie a Curie v roce 1972. Ve své publikaci popsali apoptózu jako kontrolovaný proces zániku buněk, ke kterému dochází jak během embryonálního vývoje, tak i ve zdravých tkáních. Morfologicky rozdělili apoptózu do dvou fází: formování apoptotických tělísek a jejich degradaci sousedními buňkami. Během formování apoptotických tělísek dochází ke kondenzaci a fragmentaci jádra i cytoplazmy. Tělíska jsou však kompaktní a ohraničená membránou. Podstatné je, že na rozdíl od nekrózy, dochází při apoptóze k odstranění buněk bez vzniku zánětu (Kerr et al., 1972). V následujících letech pak byl proces apoptózy popsán i na molekulární úrovni u hád'átka *Caenorhabditis elegans*, u kterého byly identifikovány první geny aktivující a regulující apoptózu – tzv. ced (cell death abnormal) geny (Ellis and Horvitz, 1986). Následně pak byly identifikovány homologní geny i u člověka. Apoptóza je tedy geneticky kontrolovaný a konzervovaný proces.

Dnes je apoptóza jedním z několika typů regulované buněčné smrti. Může být aktivována jak vnějšími (např. receptory smrti), tak i vnitřními (poškození DNA a jiný stres) stimuly (Obr. 1). Všechny tyto cesty se sbíhají v exekuční fázi. Vznikají apoptotická tělíska, která jsou fagocytována okolními buňkami. Nedochází k vylití buněčného obsahu do okolí, takže nevzniká zánět. Naproti tomu u nekrotického typu buněčné smrti, ať už regulovaného (např. nekroptóza), či náhodného (nadměrný stres – např. popálení atd.), dochází ke ztrátě membránové integrity a uvolněný buněčný obsah je příčinou zánětu (Galluzzi et al., 2014; Elmore, 2007). Mezi další programované buněčné smrti se řadí autofagická buněčná smrt, mitotická katastrofa a kornifikace (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2009).

Vnější dráha apoptózy:

– Receptory smrti

Nejnámějšími aktivátory vnější apoptotické signalizace jsou receptory smrti z rodiny TNFR. Tato signalizace je aktivována navázáním ligandů na příslušné trimerní receptory smrti a následnou konformační změnou jejich intracelulárních domén. Tyto receptory se vyznačují extracelulárními doménami bohatými na cystein a cytoplazmatickou doménou smrti (DD). Mezi známé ligandy/receptory smrti spouštějící apoptózu patří mimo jiné TNF- α /TNFR1, FasL/Fas (CD95L/CD95), TRAIL/TRAIL-R1 a TRAIL/TRAIL-R2 (Elmore, 2007).

– Signalizace z receptorů Fas/CD95, TRAIL-R1 a TRAIL-R2

Trimerní Fas ligand spouští oligomerizaci Fas/CD95 receptorů a ta je příčinou konformačních změn v cytosolické doméně Fas receptoru a navázání adapterového proteinu FADD. Na protein FADD se poté naváže kaspáza 8 a tím dojde k vytvoření komplexu DISC. Tento komplex vzniká také na receptorech TRAIL-R1 a TRAIL-R2 a kromě kaspázy 8 se do něj může vázat také kaspáza 10 a protein c-FLIP, jehož funkce bude podrobně probrána v následujících kapitolách.

Interakce mezi proteiny v komplexu DISC jsou homotypické a dochází k nim mezi odpovídajícími si doménami. Protein FADD interaguje skrze DD s DD doménou receptoru TNFR a skrze DED s DED doménou kaspázy 8. Kaspáza 8 navázaná v komplexu DISC projde autokatalytickou aktivací a vzniká aktivní heterotetramer složený ze dvou větších p18 a dvou menších p10 podjednotek. Aktivovaná kaspáza 8 pak štěpí cílové substráty, což vede k zahájení exekuční fáze apoptózy. Aktivní kaspáza 8 může přímo aktivovat efektorové kaspázy (např. kaspázu 3 či 7) - signalizační dráha typu I, a také štěpit a aktivovat protein Bid - signalizační dráha typu II. Štěpený Bid (tBid) zprostředkuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií, vznik apoptozomu a aktivaci kaspázy 9, která pak také aktivuje efektorové kaspázy (Lavrik et al., 2005). Štěpení proteinu Bid kaspázou 8 je propojením mezi vnější a vnitřní cestou apoptózy.

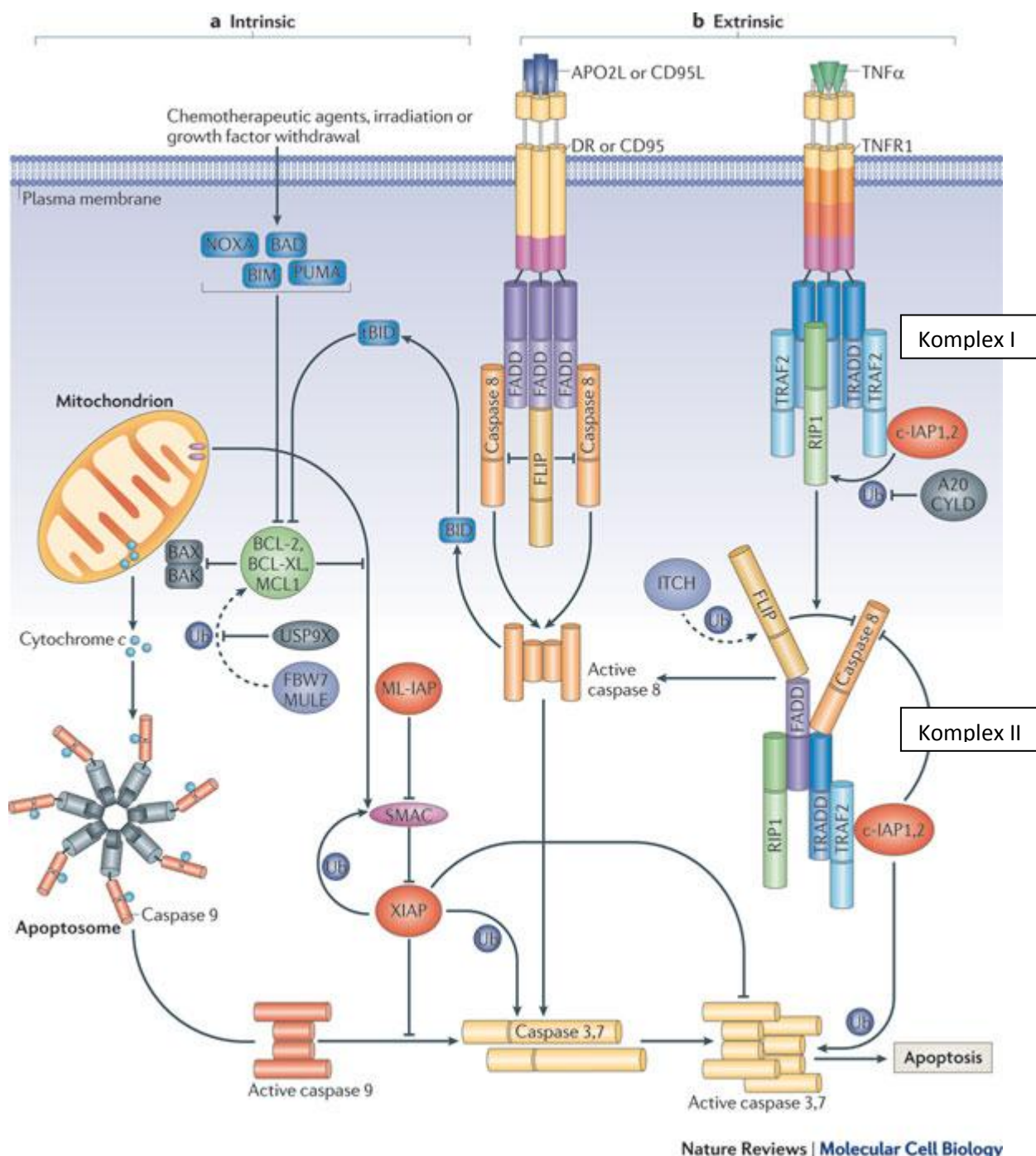
– Kaspázy

Kaspázy jsou cystein-aspartátové proteázy. Dělí se do tří skupin: iniciační (kaspázy 2, 8, 9, 10), efektorové (kaspázy 3, 6, 7) a zánětlivé (kaspázy 1, 4, 5), které nejsou součástí apoptotické signalizační kaskády. Tyto enzymy jsou exprimované jako neaktivní prokaspázy

a jsou aktivovány buď autoproteolyticky (iniciační kaspázy – např. kaspáza 8 či 9) nebo specifickým štěpením jinými proteázami (efektorové kaspázy). Po aktivaci štěpí cílové proteiny (např. další prokaspázy) v konzervované sekvenci za kyselinou asparagovou. Pro katalytickou aktivitu je klíčový cystein v aktivním místě enzymu (Elmore, 2007).

– Signalizace z receptoru TNFR1

Trochu jinak probíhá signalizace iniciovaná vazbou ligandu TNF- α na receptor TNFR1. Zde se nejprve vytvoří komplex I skládající se z ligandu TNF- α , receptoru TNFR1, proteinů TRADD, RIPK1 a TRAF2. Vznik a aktivace tohoto komplexu nevede k apoptóze, ale naopak aktivuje NF- κ B signalizační dráhu. Část komplexu I se může uvolnit a přesunout do cytosolu, kde se k proteinům TRADD, RIPK1 a TRAF2 naváže protein FADD a kaspáza 8, čímž vznikne komplex II. Stejně jako v komplexu DISC dochází v komplexu II k aktivaci kaspázy 8 a může se sem také vázat c-FLIP a tuto aktivaci blokovat (Lavrik et al., 2005).



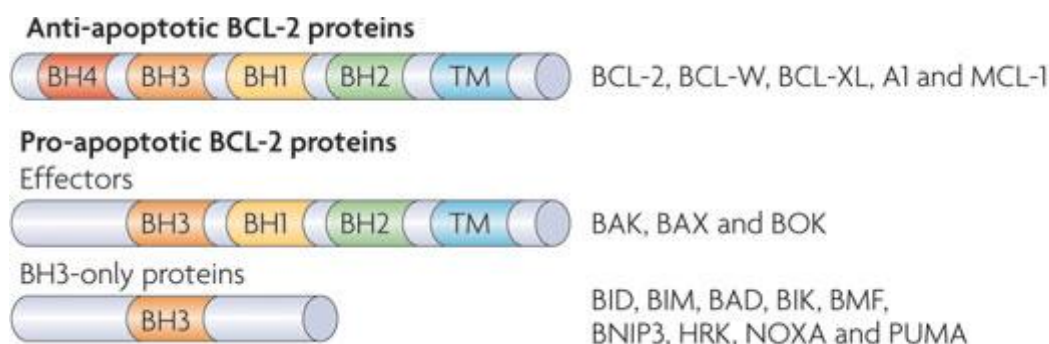
Obrázek 1: **Mechanismy aktivace apoptózy vnějšími a vnitřními signály.** Výsledkem stimulace vnější i vnitřní apoptotické dráhy je aktivování efektorových kaspáz, které následně řídí exekuci apoptózy. Převzato a upraveno podle (Vucic et al., 2011).

Vnitřní dráha apoptózy:

Mezi vnitřní faktory vyvolávající apoptózu se řadí např. poškození DNA, oxidativní stres, virové infekce, radiace nebo nedostatek růstových faktorů.

– Bcl-2 proteiny

V regulaci vnitřní a částečně i vnější dráhy apoptózy mají nezastupitelnou úlohu proteiny z Bcl-2 rodiny (Obr. 2). Jedná se o početnou rodinu proteinů, které disponují jak proapoptotickými, tak i antiapoptotickými vlastnostmi. Pro přehlednost můžeme tyto proteiny rozdělit do tří skupin: antiapoptotické (Bcl-2, Bcl-XL, MCL1), proapoptotické (BAX, BAK) a BH3-only proteiny (BID, BIM, BAD, NOXA, PUMA).



Obrázek 2: **Přehled vybraných Bcl-2 proteinů.** Proteiny jsou rozděleny do tří skupin na základě výskytu Bcl-2 homologních domén. Převzato a upraveno podle (Tait and Green, 2010).

Antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-XL blokuji apoptózu tím, že inhibují proapoptotické proteiny BAX a BAK. Jejich funkce je regulována proapoptotickými BH3-only proteiny, které se na Bcl-2 a Bcl-XL váží a tím je inhibují. Případně mohou některé BH3-only proteiny (BIM, tBID, PUMA) přímo aktivovat BAX a BAK (Youle and Strasser, 2008).

– Aktivace permeabilizace vnější mitochondriální membrány a vzniku apoptozomu

Pokud nejsou proteiny BAX a BAK nijak inhibovány, způsobí permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP). Při MOMP jsou uvolněny proapoptotické proteiny (cytochrom c, SMAC/DIABLO) z mezimembránového prostoru mitochondrií. Důsledkem je aktivace kaspázové kaskády vedoucí k apoptóze (Tait and Green, 2010).

Cytochrom c uvolněný z mitochondrií se váže na protein APAF1. Tím vzniká heptamerní komplex, který váže a aktivuje kaspázu 9. Tento komplex se nazývá apoptozom. Aktivní kaspáza 9 však může být inhibována proteinem XIAP z rodiny IAP. K účinné aktivaci apoptózy a k inaktivaci proteinu XIAP je nezbytný protein SMAC/DIABLO též uvolněný při

MOMP (Youle and Strasser, 2008). Proteiny z rodiny IAP (např. c-IAP1, c-IAP2, XIAP) blokují aktivaci efektorových kaspáz a jsou tak součástí vnější i vnitřní apoptotické dráhy (Lavrik et al., 2005).

Exekuční fáze:

Vnější a vnitřní cesta apoptózy se setkávají v bodě aktivace efektorových kaspáz, kdy začíná exekuční fáze apoptózy. Efektorové kaspázy 3, 6 a 7 aktivují nukleázy, proteázy a také štěpí vlastní cílové substráty (např. protein PARP, cytokeratiny, ICAD – inhibitor endonukleázy CAD, gelsolin a stovky dalších proteinů – viz databáze substrátů kaspáz na <http://caspdb.sanfordburnham.org/tutorial.php> (Kumar et al., 2014). Výsledkem je degradace DNA, jaderných i cytoskeletárních proteinů a významné narušení intracelulárního transportu a signalizace. Jak již bylo zmíněno na začátku kapitoly, dochází v apoptotických buňkách ke značným morfologickým změnám (tvorba apoptotických tělísek), ale i molekulárním změnám (externalizace fosfatidylserinu), díky kterým okolní či specifické buňky (např. makrofágy) apoptotickou buňku fagocytují (Elmore, 2007).

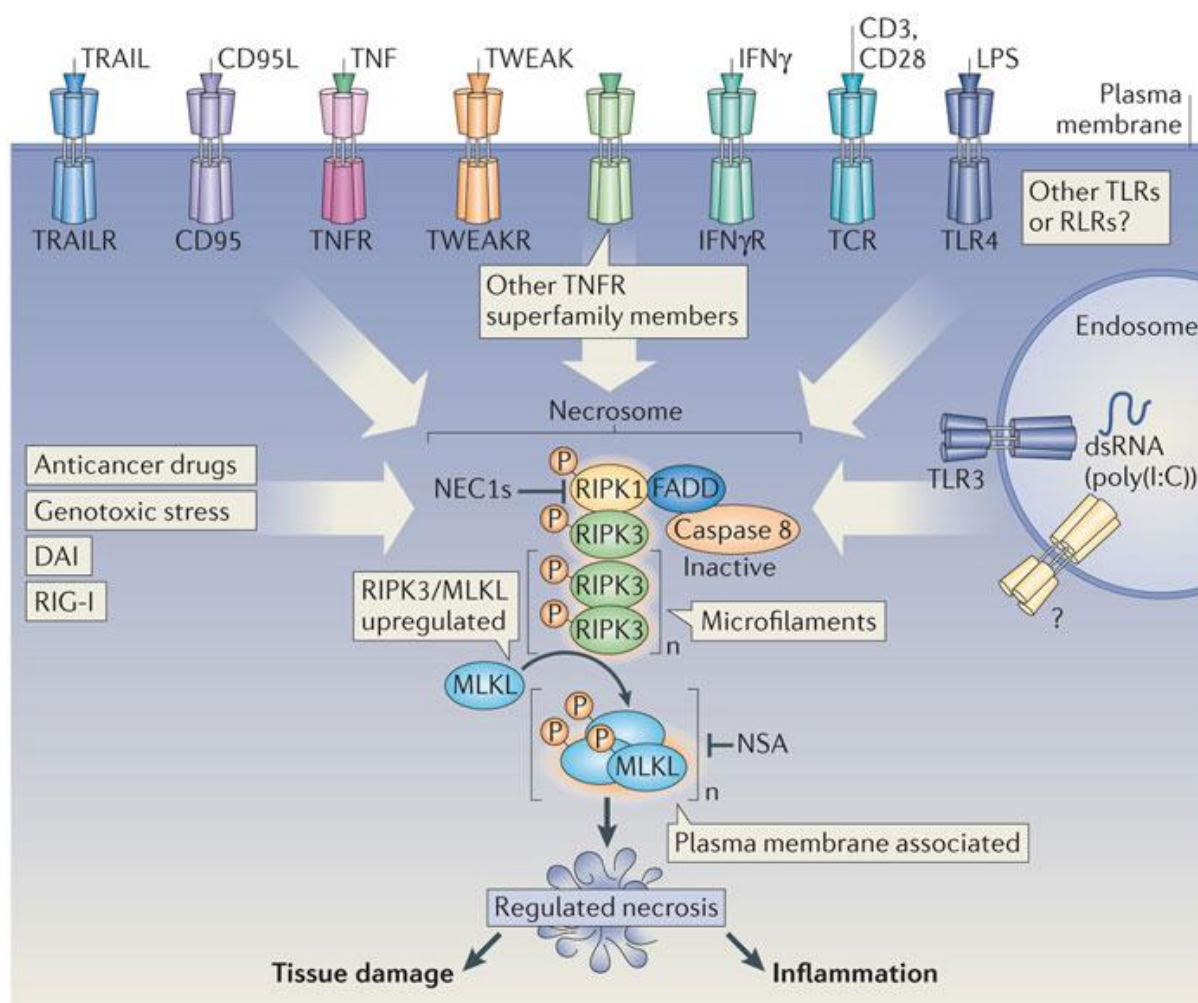
2) Nekróza a nekroptóza:

Nekróza je zánětlivý typ buněčné smrti, při které dochází k zvětšení objemu buňky, prasknutí plazmatické membrány a vylití buněčného obsahu do okolí. Dlouho se předpokládalo, že se jedná o neregulovaný proces. V posledních několika letech ale byly objeveny dráhy, které nekrózu regulují. Nekroptóza je jedním z typů regulované (programované) nekrózy (Kroemer et al., 2009).

Nekrozom:

Nekroptózu mohou iniciovat různé podněty jako např. TNF, TRAIL, Fas ligand (CD95L), lipopolysacharidy (LPS), dsRNA a další (Obr. 3). Pro nekroptózu je však stěžejní formování komplexu zvaného nekrozom. Tento komplex vzniká asociací kináz RIPK1 a RIPK3, které vytvářejí kostru celého komplexu. Vznik tohoto pronekrotického komplexu je mimo jiné podmíněn inaktivací kaspázy 8 (štěpí RIPK1) a apoptotické signalizační dráhy. Kinázy RIPK1 a RIPK3 patří do stejné rodiny a obsahují RHIM a N-terminální kinázovou

doménu. Skrze c-terminální RHIM doménu spolu mohou tyto kinázy interagovat. Kináza RIPK1 navíc obsahuje DD doménu. RIPK1 a RIPK3 se při formování nekrozomu autofosforylují a transfosforylují. Fosforylovaný RIPK3 pak mimo jiné fosforyluje a aktivuje protein MLKL. Aktivovaný MLKL poté oligomerizuje, translokuje se do plazmatické membrány a jiných buněčných membrán, ve kterých vytvářením pórů indukuje nekroptózu (Vanden Berghe et al., 2014).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obrázek 3: **Programovaná nekróza.** Přehled faktorů indukujících vznik nekrozomu, stěžejního intracelulárního komplexu v exekuci nekroptózy. Převzato z (Vanden Berghe et al., 2014)

3) Objev proteinu c-FLIP:

V roce 1997 byly u γ -herpesvirů a tumorigenních lidských molluscipoxvirů objeveny proteiny, které inhibovaly apoptózu indukovanou ligandem FasL a které byly sekvenčně a strukturně podobné kaspáze 8 (v té době nazývané FLICE) (Bertin et al., 1997; Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a). Tyto cca 30 kDa proteiny pojmenované v-FLIP obsahují dvě DED domény stejně jako kaspázy 8 a 10, či adapterový protein FADD obsahující pouze jednu DED doménu. Pomocí homotypických interakcí mezi DED doménami interagují proteiny v-FLIP s prokaspázou 8 a proteinem FADD. Antiapoptotická role v-FLIP pak spočívá v zabránění akumulace prokaspázy 8 v aktivačním komplexu DISC a tím i její autoproteolytické aktivace. Proteiny v-FLIP tak potlačují apoptózu spuštěnou receptory z rodiny TNFR – např. Fas a TNFR1.

Krátce poté byly několika skupinami identifikovány proteiny FLIP u savců (Goltsev et al., 1997; Han et al., 1997; Hu et al., 1997b; Inohara et al., 1997; Irmeler et al., 1997; Shu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Rasper et al., 1998). Každá skupina nazvala protein jinak, proto má několik názvů (c-FLIP, CASH, Casper, CLARP, I-FLICE, MRIT, FLAME, Usurpin). Nejčastěji je používán název CFLAR a c-FLIP.

Zajímavé je, že proteiny c-FLIP byly objeveny různými metodickými přístupy a také jim byli přisuzovány různé funkce. Někteří autoři identifikovali c-FLIP na základě homologie s proteiny v-FLIP (Irmeler et al., 1997), proteinem FADD (Shu et al., 1997), kaspázou 8 (Han et al., 1997; Inohara et al., 1997) či proteiny obsahujícími DED doménu (Srinivasula et al., 1997). Goltsev et al. zase objevili c-FLIP (cellular FLIP) jako protein vázající kaspázu 10. Podobně jako v-FLIP byli tyto nově objevené proteiny charakterizovány jako inhibitory apoptózy spuštěné receptory Fas a TNFR1 (Goltsev et al., 1997; Irmeler et al., 1997; Hu et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997). Avšak oproti v-FLIP bylo také zjištěno, že lidské c-FLIP proteiny mohou apoptózu vyvolávat (Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Shu et al., 1997; Han et al., 1997).

4) Gen c-FLIP:

Lidský c-FLIP:

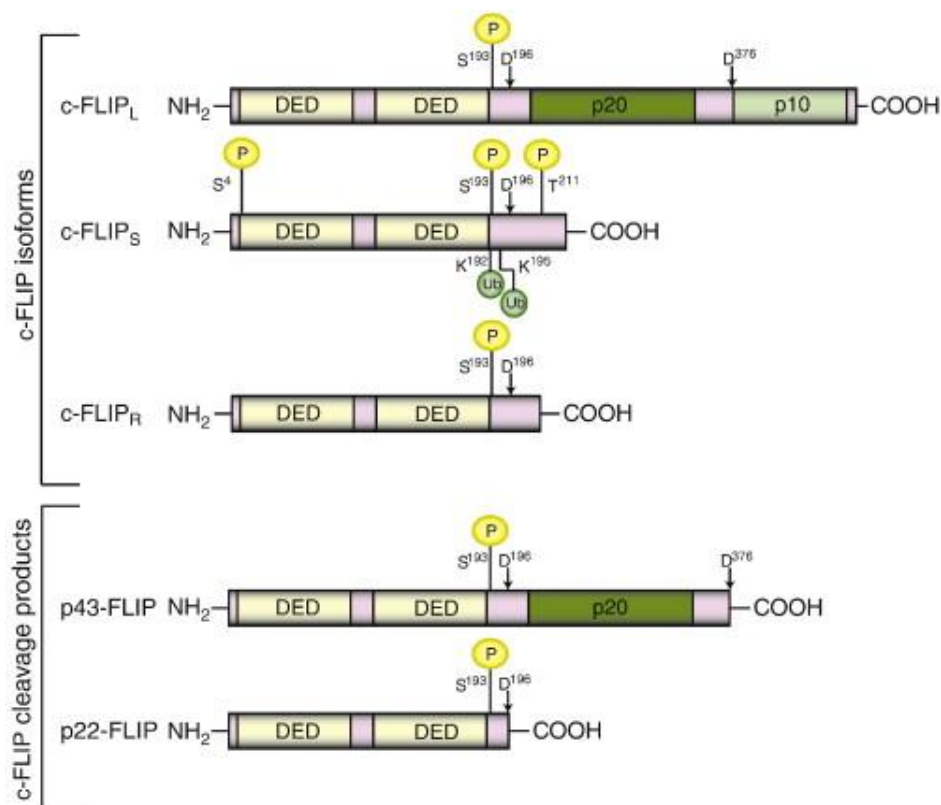
Gen pro protein c-FLIP se nazývá CFLAR. U Člověka je lokalizován na dlouhém raménku (2q33-q34) druhého chromozomu v těsné blízkosti genů pro kaspázu 8 a 10. Tyto tři geny (každý o délce zhruba 40 kbp) leží v úseku kratším než 200 kbp (Djerbi et al., 2001). Navíc jsou přepisovány ve stejném směru, od centromery k telomeře (Hadano et al., 2001). Všechny tyto geny obsahují dvě DED domény a vzhledem k jejich blízkosti a sekvenční homologii je možné, že vznikly genovou duplikací (Irmmler et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Rasper et al., 1998).

CFLAR je kódován 48 kbp dlouhým úsekem DNA, obsahuje 14 exonů a alternativním sestřihem z něj může vzniknout až 15 různých izoform. Na proteinové úrovni však byly v buňkách identifikovány především tyto 3 izoformy: c-FLIP_L, c-FLIP_S a c-FLIP_R (Obr. 4).

Izoforma c-FLIP_L se nejvíce podobá kaspáze 8 a 10. 480 aminokyselin tvořících tuto izoformu kóduje dvě efektorové domény smrti (DED) a doménu podobnou peptidásové doméně kaspáz (CLD). DED1 leží na exonu 3, DED2 na exonech 3-5, CLD se rozkládá od půlky exonu 6, přes exony 8-10 a 12 až na exon 14. Důležitý QNYVVV motiv a místo štěpení mezi velkou a malou podjednotkou CLD leží na exonu 12 (Djerbi et al., 2001).

c-FLIP_S je strukturně srovnatelný s proteiny v-FLIP. Je tvořen dvěma DED doménami a dalšími přibližně 50 aminokyselinami na C-konci (Irmmler et al., 1997). C-FLIP_S (221 aminokyselin) je tedy kratší než c-FLIP_L.

c-FLIP_R je odvozen z lidského Burkittova lymfomu B buněčné linie Raji (Djerbi et al., 2001). Přestože má nejkratší sestřihová varianta c-FLIP_R nejkratší aminokyselinovou sekvenci (213 aminokyselin), tak je kódován nejdelší mRNA (1600 bp). Jelikož má protein c-FLIP_R velmi podobnou velikost jako c-FLIP_S (211 aminokyselin) jsou tyto izoformy často zaměňovány. Již v práci (Scaffidi et al., 1999) v analýze exprese proteinu c-FLIP v odlišných buněčných liniích je izoforma c-FLIP_R rozeznatelná, avšak označená jako c-FLIP_S (Golks et al., 2005). mRNA pro c-FLIP_R je dlouhá 1600 bp, 5' i 3' konec se shoduje s mRNA pro c-FLIP_S, ale mezi nimi je vložen úsek 934 nukleotidů. V mRNA c-FLIP_R nedochází k sestřihu mezi exony 6 a 7, a tak se translace předčasně ukončí v intronu za exonem 6 (Djerbi et al., 2001).



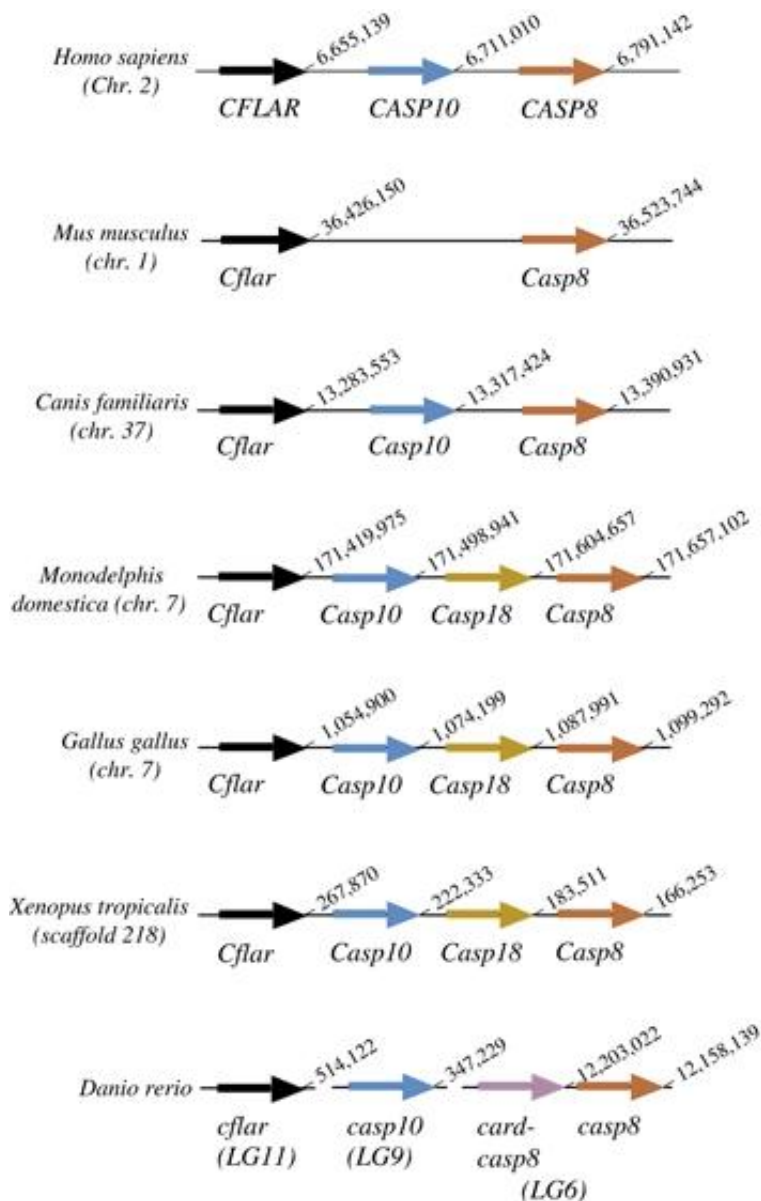
Obrázek 4: **Izoformy a štěpné produkty proteinu c-FLIP.** Obrázek znázorňuje domény jednotlivých variant proteinu c-FLIP a také místa štěpení a posttranslačních modifikací. Převzato z (Öztürk et al., 2012).

c-FLIP u savců a dalších obratlovců:

Gen kódující protein c-FLIP a jeho izoformy byl nalezen u mnoha obratlovců včetně ryb (Eimon et al., 2006). Kromě lidského genu CFLAR je nejlépe analyzovaný gen pro protein c-FLIP kódovaný myším genomem. Ten se skládá z deseti exonů. U myši chybí exon 7 a nevzniká tak izoforma c-FLIP_S. Jedinou krátkou izoformou u myši a i u potkana je c-FLIP_R (Ueffing et al., 2008). Exon 7 se nachází pouze u vyšších savců a tak se předpokládá, že c-FLIP_R je původní krátkou izoformou a c-FLIP_S vznikl později v evoluci (Ueffing et al., 2009).

CFLAR gen je bez duplikací či delecí konzervován zejména u savců (kromě myši a potkana doložen také u vačic, krav, psů, morčat, makaků a šimpanzů) (Eckhart et al., 2008). CFLAR se u člověka vyskytuje společně s geny pro kaspázu 8 a 10 a společný výskyt těchto tří genů najdeme i u dalších savců, ptáků i obojživelníků (Obr. 5). Výjimkou je myš, které schází gen pro kaspázu 10 (Sakata et al., 2007). Navíc byl objeven další homologní gen nacházející se mezi kaspázou 10 a 8 u kuřete a žáby (*Xenopus tropicalis*), pojmenovaný

kaspáza 18. Kaspáza 18 se nachází i u vačnatců a vejcorodých, takže se zdá, že jde o starší gen, který ale u placentálních savců vymizel (Sakamaki and Satou, 2009).



Obrázek 5: **Shluk genů příbuzných kaspáze 8 u obratlovců.** Genomická organizace genů pro kaspázu 8, kaspázu 10, c-FLIP a dalších příbuzných genů u člověka, myši, psa, vačice, kuřete, žáby a ryby (řazeno od shora). Převzato z (Sakamaki and Satou, 2009).

Jiné uspořádání těchto genů pak najdeme u ryb. Geny pro c-FLIP, kaspázu 8 a 10 zde netvoří jeden shluk jako u savců, ale nacházejí se na různých chromozomech, tudíž u ryb pravděpodobně došlo k přeskupení těchto genů (Sakata et al., 2007). Navíc byl u ryb objeven ještě další gen podobný kaspáze 8. Jelikož obsahuje CARD motiv, byl nazván card-casp8 (Sakamaki et al., 2007).

Hypoteticky vznikly geny pro c-FLIP, kaspázu 8, kaspázu 10, kaspázu 18 a card-casp8 z jednoho původního ancestrálního genu (Sakata et al., 2007).

5) Regulace exprese a množství proteinu c-FLIP:

Expres a množství proteinu c-FLIP v buňce je regulováno na mnoha úrovních. Kromě vlastní exprese mRNA jsou regulovány také sestřih a vznik různých izoform proteinu c-FLIP, translace, posttranslační modifikace a také stabilita a degradace proteinu.

Regulace transkripce:

Na transkripční úrovni ovlivňuje expresi proteinu c-FLIP mnoho transkripčních faktorů, které mohou transkripci c-FLIP mRNA zvyšovat i snižovat. Úroveň transkripce je dána tím, které transkripční faktory jsou v danou chvíli aktivovány. Aktivaci transkripčních faktorů ovlivňují vnější faktory jako interleukiny, chemokiny, TNF ligandy, růstové faktory nebo např. chemoterapeutika (Shirley and Micheau, 2013). Příklady transkripčních faktorů aktivujících/deaktivujících transkripci genu pro protein c-FLIP jsou níže uvedeny v Tab. 1.

Transkripční faktory genu pro protein c-FLIP			
Zvyšující expresi		Snižující expresi	
AR	NF-κB	c-Fos/c-Jun	IRF5
CREB	par-4	c-myc	SC35
EGR1	p53	E2F1	sp-3
hnRNP k	p63	ERβ	
NF-ATc2	sp-1	Foxo3a	

Tabulka 1: **Přehled známých transkripčních faktorů zvyšujících a snižujících expresi c-FLIP mRNA.** Sestaveno na základě zdrojů uvedených v této kapitole.

Transkripční faktor NF-κB indukuje transkripci různých antiapoptotických genů (TRAF1, TRAF2, cIAP-1, cIAP-2, A1, A20 (Micheau et al., 2001)) včetně proteinu c-FLIP. Tento transkripční faktor důležitý v ochraně buněk před apoptózou, je aktivován např. LPS (Micheau et al., 2001), IL-1, TNF nebo CD-40 (Kreuz et al., 2001). NF-κB zvyšuje expresi c-FLIP_L i c-FLIP_S, avšak nemá vliv na izoformu c-FLIP_R, jejíž expres je indukována odlišným

způsobem nezávislým na NF- κ B (Rushworth et al., 2008). Mimo to, že NF- κ B indukuje transkripci proteinu c-FLIP, tak není bez zajímavosti, že i c-FLIP zvyšuje aktivaci NF- κ B (Hu et al., 2000; Kataoka et al., 2000). Mezi těmito dvěma proteiny funguje pozitivní zpětnovazebná regulace.

NF-AT, EGR1 a tumor supresorový protein p53 zvyšují expresi krátké izoformy c-FLIP_S více než izoformy c-FLIP_L (Bartke et al., 2001; Mahalingam et al., 2010; Ueffing et al., 2010). Vznik c-FLIP_R je pozitivně regulován transkripčním faktorem p63 (Borrelli et al., 2009). Naproti tomu pak CREB indukuje expresi izoformy c-FLIP_L (Zhang et al., 2008).

Dalšími regulátory exprese proteinu c-FLIP jsou hnRNP K, androgenní receptor (AR) a jeho koaktivátor par-4. hnRNP K tvoří komplex s nucleolinem a váže se na poly(C) element (-26 až -22 od místa začátku transkripce) v promotoru genu CFLAR a tím aktivuje jeho transkripci (Chen et al., 2010b). AR zvyšuje expresi proteinu c-FLIP v přítomnosti androgenů (Gao et al., 2005). Jeho koaktivátorem je transkripční faktor par-4, který se tím pádem také podílí na regulaci transkripce tohoto genu (Gao et al., 2006). Zajímavé také je, že se AR váže s proteinem Foxo3a a společně s ním reguluje expresi proteinu c-FLIP (Cornforth et al., 2008).

Dalším transkripčním faktorem zvyšujícím expresi proteinu c-FLIP je Sp-1. Zvýšená transkripce zprostředkovaná působením Sp-1 může být inhibována příbuzným transkripčním faktorem Sp-3 (Ganapathy et al., 2009). Ve výsledku tudíž závisí na poměru obou transkripčních faktorů a také na proteinu ER β , který s Sp-1 a Sp-3 soutěží o vazbu k promotoru a je negativním regulátorem exprese proteinu c-FLIP (Yun et al., 2015).

Mezi transkripční faktory snižující expresi proteinu c-FLIP se řadí c-myc (Ricci et al., 2004), Foxo3a, který je regulován kinázou Akt (Skurk et al., 2004) a protein c-Fos, který tvoří dimer s proteinem c-Jun a vzniká tak AP-1 komplex potlačující expresi proteinu c-FLIP (Zhang et al., 2007; Li et al., 2007). Na druhou stranu jaderně lokalizovaný c-FLIP_L může fungovat jako transkripční faktor aktivující AP-1 komplex (Zhang et al., 2009).

Regulace sestřihu a vzniku různých izoform proteinu c-FLIP:

Vznik různých izoform proteinu c-FLIP je regulován alternativním sestřihem. Pokud je v mRNA zachován exon 7, vzniká izoforma c-FLIP_S, pokud je exon přeskočen, vzniká c-FLIP_L (Ueffing et al., 2009). Tento alternativní sestřih je regulován např. E2F1, který

specificky inhibuje expresi izoformy c-FLIP_S (Salon et al., 2006). E2F1 zvyšuje expresi proteinu SC35 a ten poté reguluje sestřih pre-mRNA a inhibuje vznik izoformy c-FLIP_S (Merdzhanova et al., 2008).

Pokud je v transkriptu zahrnut intron 6, vzniká třetí izoforma c-FLIP_R. Právě ve 3' sestřihovém místě intronu 6 se nachází SNP (rs10190751 A/G) určující, která z krátkých izoform proteinu c-FLIP bude vznikat. Pokud se v sestřihovém místě nachází guanin, vzniká c-FLIP_S, v opačném případě je exprimován c-FLIP_R (Chauhan et al., 2015; Ueffing et al., 2009).

Regulace translace:

Jedním ze způsobů regulace exprese proteinu c-FLIP na úrovni translace je inhibice fosforylace translačního iniciačního faktoru eIF4E (Bleumink et al., 2011). Tento translační faktor je nezbytný pro iniciaci translace, protože rozeznává a váže se na 5' mRNA čepičku. Jeho aktivace je regulována signálními drahami ERK a PI3K. Bylo potvrzeno, že obě tyto dráhy regulují expresi proteinu c-FLIP (Aoudjit and Vuori, 2001; Panka et al., 2001; Wang et al., 2002).

Posttranskripčně je exprese proteinu c-FLIP regulována prostřednictvím miRNA. miR-512-3p asociuje s 3'UTR na mRNA proteinu c-FLIP a touto interakcí snižuje jeho expresi. Mechanismus snížení exprese proteinu c-FLIP pomocí miR-512-3p pravděpodobně spočívá v regulaci translace a ne v ovlivnění stability mRNA (Chen et al., 2010a).

Posttranslační modifikace, stabilita a degradace proteinu c-FLIP:

Mezi posttranslační modifikace proteinu c-FLIP patří především nitrosylace, fosforylace a ubiquitinace (Obr. 4). Tyto modifikace ovlivňují stabilitu a degradaci proteinu c-FLIP v závislosti na buněčném typu a okolnostech.

– Nitrosylace

Oxid dusnatý (NO) je příčinou nitrosylace proteinů a mezi jinými také za S-nitrosylaci proteinu c-FLIP. Touto modifikací chrání NO protein c-FLIP před ubiquitinací a degradací v proteasomu (Chanvorachote et al., 2005). K nitrosylaci dochází v CLD doméně, přičemž modifikovanými aminokyselinami jsou hlavně Cys254 a Cys259. Dalším důsledkem S-

nitrosylace proteinu c-FLIP je, že zvyšuje aktivaci NF- κ B dráhy, a to dvěma způsoby: jednak zvyšuje štěpení proteinu c-FLIP na kratší p22-FLIP a také inhibuje vazbu k proteinu RIP (Talbot et al., 2014).

– Fosforylace

Všechny izoformy c-FLIP_{L/S/R} jsou fosforylovány kinázami PKC α a PKC β patřících do rodiny serin/threonin kináz. V proteinu c-FLIP je fosforylován serin Ser193. Tato modifikace neovlivňuje schopnost proteinu c-FLIP vázat se v komplexu DISC ani regulovat aktivaci kaspázy 8, avšak má důležitou funkci v regulaci ubiquitinace proteinu c-FLIP. Jelikož polyubiquitinace často vede k degradaci proteinu v proteasomu, má fosforylace proteinu c-FLIP vliv na jeho stabilitu. Konkrétně fosforylace Ser193 zvyšuje stabilitu krátkých izoform c-FLIP_S a c-FLIP_R, zatímco stabilitu c-FLIP_L neovlivňuje. Tímto nepřímým způsobem reguluje PKC α a PKC β i buněčnou smrt (Kaunisto et al., 2001).

Opačný vliv má fosforylace Ser273 v CLD doméně izoformy c-FLIP_L, která není přítomná v krátkých izoformách proteinu c-FLIP_{S/R}. V tomto případě je c-FLIP_L fosforylován kinázou Akt, která je závislá na PI3K dráze. Důsledkem této fosforylace je snížení množství proteinu c-FLIP_L (Shi et al., 2009). Další kinázou fosforylující protein c-FLIP je CaMK II. Tato kináza fosforyluje výhradně izoformu c-FLIP_L (Yang et al., 2003). Kromě fosforylace CaMK II také zvyšuje expresi proteinu c-FLIP_L i c-FLIP_S (Xiao et al., 2005; Yang et al., 2007).

Vliv na fosforylaci má také žlučová kyselina GCDCA, která indukuje fosforylaci proteinu c-FLIP a také snižuje jeho vazebnou afinitu k proteinu FADD a vazbu do komplexu DISC (Higuchi et al., 2003). V tomto případě je protein c-FLIP pravděpodobně také fosforylován PKC, protože žlučové kyseliny PKC aktivují (Jones et al., 1997). Pokud tomu tak opravdu je, tak je c-FLIP dle mého názoru fosforylován na aminokyselinách jiných než Ser193, kinázou odlišnou od PKC α a PKC β . Usuzuji tak z toho, že fosforylace indukované GCDCA a PKC α /PKC β mají rozporný vliv na vazbu proteinu c-FLIP v komplexu DISC.

Protein kináza c-Abl fosforyluje Tyr211 a kináza p38 fosforyluje Ser4 v izoformě c-FLIP_S. K interakci proteinu c-FLIP_S s kinázou p38 jsou důležité následující aminokyseliny: Lys134, Leu139, Val140 a Ile141. Fosforylace c-FLIP_S na Ser4 a Tyr211 ovlivňuje stabilitu této izoformy, je totiž nezbytná k ubiquitinaci a následné degradaci (Kundu et al., 2009). Fosforylace proteinu c-FLIP_S je inhibována kinázou p38 α , což také vede ke snížení vazby c-FLIP_S ke komplexu DISC (Tourian et al., 2004).

Polyubiquitinace proteinu c-FLIP vede, stejně jako u mnoha jiných proteinů, k jeho degradaci. V případě proteinu c-FLIP je známá ubiquitin ligáza Itch, která interaguje s izoformou c-FLIP_L skrze CLD doménu, ubiquitínuje ji a předurčuje k degradaci (Chang et al., 2006). Později bylo zjištěno, že ligáza Itch ubiquitínuje také c-FLIP_S (Abedini et al., 2008). Ubiquitin ligáza Itch je fosforylována a aktivována kinázou JNK1 (Chang et al., 2006). Roli v degradaci proteinu c-FLIP prostřednictvím ubiquitin ligázy Itch má také protein p53. Ten nejen jako transkripční faktor zvyšuje expresi proteinu c-FLIP, ale i posttranslačně ovlivňuje množství tohoto proteinu tím, že se váže jak k němu, tak i k ligáze Itch, a aktivuje tak ubiquitinaci a degradaci proteinu c-FLIP v proteasomu (Abedini et al., 2008; Fukazawa et al., 2001). Izoforma c-FLIP_S je navíc ještě modifikována ubiquitin ligázou c-Cbl. Pro tuto modifikaci je nezbytná fosforylace proteinu c-FLIP_S na Ser4 a Tyr211 (Kundu et al., 2009).

Co se stability týče, tak nejstabilnější izoformou je c-FLIP_L. c-FLIP_S a c-FLIP_R mají velmi podobný stabilitní profil a obě izoformy jsou méně stabilní než c-FLIP_L (Ueffing et al., 2009). Za krátký poločas výskytu izoformy c-FLIP_S je zodpovědný její specifický C-konec, konkrétně posledních 19 aminokyselin. Tento konec není zodpovědný za antiapoptotickou funkci, a třebaže na něm nedochází k ubiquitinaci proteinu, tak se podílí na regulaci jeho stability. V proteinu c-FLIP_S jsou ubiquitinovány Lys192 a Lys195. Díky strukturnímu uspořádání, které se kvůli jinému C-konci liší od izoformy c-FLIP_L, dochází k ubiquitinaci právě na těchto aminokyselinách. V případě c-FLIP_L dochází k ubiquitinaci na jiných aminokyselinách (Poukkula et al., 2005).

Dalším místem podléhajícím ubiquitinaci a předurčujícím protein c-FLIP k degradaci, je Lys167. K posttranslační modifikaci Lys167 je vyžadována fosforylace Thr166. Modifikace těchto dvou aminokyselin a následná degradace proteinu c-FLIP je vyvolána ROS (Wilkie-Grantham et al., 2013).

6) Struktura proteinu c-FLIP:

Protein c-FLIP_L má molekulovou hmotnost přibližně 55 kDa (Shu et al., 1997) a je strukturně podobný kaspáze 8. Na N-konci se nacházejí dvě DED domény (DED1 1-73 aa, DED2 92-170 aa) tvořené šesti a pěti α -helixy. Díky těmto doménám může c-FLIP interagovat s dalšími proteiny, které také DED doménu obsahují. V C-koncové části je pak lokalizována proteolyticky neaktivní kaspáze 8 podobná doména (CLD 263-358 aa) (Hwang et al., 2013). Tato doména skládající se z malé a velké podjednotky obsahuje šest β -listů, které jsou obklopené na jedné straně dvěma a na druhé třemi α -helixy. Podstatným rozdílem mezi CLD doménou proteinu c-FLIP_L a doménou kaspázy 8 je pozice smyčky L3. Tato smyčka tvoří v kaspáze 8 dno žlábků, ve kterém dochází k vazbě substrátu. V CLD proteinu c-FLIP_L se tento žlábek nenachází, jelikož na místě L3 je umístěn α -helix (Yu et al., 2009).

Pro proteázovou aktivitu kaspáz jsou klíčové jednak čtyři aminokyseliny vázající karboxylový postranní řetězec kyseliny asparagové, jednak tři aminokyseliny podílející se přímo na štěpení daného peptidu. Na rozdíl od kaspázy 8, c-FLIP_L obsahuje pouze dvě (glutamin, serin) ze čtyř aminokyselin (arginin, glutamin, arginin, serin) zodpovědných za vazbu substrátu a pouze jednu (glycin) ze tří konzervovaných aminokyselin (cystein, glycin, histidin) podílejících se na štěpení. U kaspázy 8 je esenciální cystein, který je konzervován s dalšími aminokyselinami v krátkém motivu QAC(R/Q)G, avšak c-FLIP_L v tomto úseku obsahuje aminokyseliny QNYVV. Vzhledem k těmto změnám ztratil c-FLIP_L kaspázovou proteolytickou aktivitu (Han et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Rasper et al., 1998; Hu et al., 1997b).

I přesto, že c-FLIP_L není proteolyticky aktivní, obsahuje na obdobných místech jako kaspáza 8 podobnou cílovou sekvenci pro štěpení tímto enzymem. Při interakci s kaspázou 8 v komplexu DISC je c-FLIP_L štěpen za kyselinou asparagovou (D376) v sekvenci LEVDG (Shu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Irmeler et al., 1997).

Variantám c-FLIP_S a c-FLIP_R chybí CLD doména. Skládají se tedy ze dvou DED domén a jsou oproti c-FLIP_L kratší (221 aa c-FLIP_S a 213 aa c-FLIP_R oproti 480 aa c-FLIP_L). Tyto dvě DED domény navzájem asociují převážně skrze hydrofobní interakce. Toto hydrofobní spojení je konzervováno u všech proteinů, které obsahují tandem DED domén. Vyskytuje se tedy jak u proteinu c-FLIP_{L/S/R}, tak i u proteinu v-FLIP, kaspázy 8 a kaspázy 10 (Li et al., 2006).

7) Funkce proteinu c-FLIP v apoptóze:

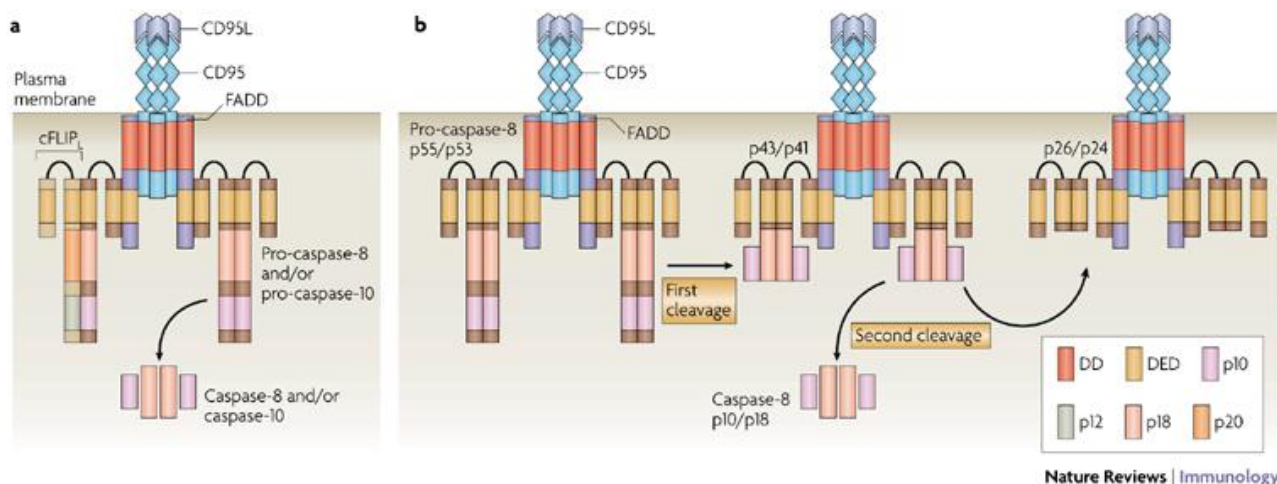
Na rozdíl od proteinů v-FLIP s jasnou antiapoptotickou funkcí si publikovaná data týkající se funkce buněčných proteinů c-FLIP značně protířely (Hu et al., 1997a; Thome et al., 1997). Protein c-FLIP byl charakterizován jako inhibitor apoptózy spuštěné receptory Fas a TNFR1 (Goltsev et al., 1997; Irmeler et al., 1997; Hu et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997), ale také jako protein proapoptotický, vyvolávající v důsledku kondenzaci a fragmentaci jádra (Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Shu et al., 1997; Han et al., 1997). Kromě Fas- a TNFR1-indukované apoptózy, se protein c-FLIP účastní také regulace apoptózy spuštěné receptory DR3, TRAIL-R1 a TRAIL-R2 (Scaffidi et al., 1999; Djerbi et al., 2001). Podstatou jak antiapoptotické, tak i proapoptotické funkce proteinu c-FLIP je jeho interakce s kaspázou 8 (Irmeler et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Han et al., 1997).

Štěpení a aktivace kaspázy 8:

Kaspáza 8 je v buňce exprimována ve formě neaktivního proenzymu (prokaspáza 8) a vyskytuje se ve dvou izoformách – kaspáza 8a/b (p55/53). Žádné funkční rozdíly mezi nimi však nejsou známy (Hughes et al., 2009). Prokaspáza 8 ještě není proteolyticky aktivní, avšak může se vázat k proteinu FADD v komplexu DISC. V tomto komplexu interagují dvě prokaspázy 8 mezi sebou skrze jejich DED domény, a tím se i jejich kaspázové domény dostávají do vzájemného kontaktu. Vznik tohoto dimeru způsobí konformační změnu vedoucí k dvoustupňovému vzájemnému štěpení prokaspázy 8 (p55/53) (Obr. 6). V prvním kroku vznikne štěpením homodimeru p55/53 malá podjednotka p10 a podjednotka p43/41. Ve druhém kroku dochází ke štěpení v rámci p43/41 podjednotky, čímž vznikne velká podjednotka p18 a samotná prodoména (p26/24). Dvě velké (p18) a dvě malé (p10) podjednotky pak vytvářejí aktivní $(p10/p18)_2$ heterotetramer. Toto dvoukrokové štěpení probíhá vždy v přesně daném pořadí. Je to dáno tím, že region mezi velkou podjednotkou a prodoménou je ke štěpení přístupný až ve chvíli, kdy je odštěpena malá podjednotka (Chang et al., 2003).

Vznik aktivní konformace kaspázy 8 je nezávislý na jejím štěpení. Ke štěpení dochází až po vzniku aktivní konformace, která je důsledkem dimerizace a strukturního přeskupení (Boatright et al., 2004). Během aktivace kaspázy 8 také dochází ke změně substrátové specifity enzymu. V dimeru prokaspáz 8 může docházet ke štěpení pouze mezi těmito proenzymy, naopak aktivní heterotetramer kaspázy 8 je uvolněn do cytosolu, kde štěpí a

aktivuje prekuzory efektorových kaspáz, avšak neštěpí své vlastní prekuzory (Chang et al., 2003).



Obrázek 6: **Aktivace prokaspázy 8.** První a druhý krok štěpení prokaspázy 8 vedoucí ke vzniku aktivního (p10/p18)₂ heterotetrameru. Převzato z (Krammer et al., 2007).

Interakce s proteinem FADD:

Adaptorový protein FADD je schopen vázat protein c-FLIP i kaspázu 8. K vazbám dochází mezi DED doménami těchto proteinů, přičemž protein FADD obsahuje jednu DED doménu, c-FLIP a kaspáza 8 disponují dvěma DED doménami ležícími za sebou. K asociaci těchto proteinů dochází až po navázání ligandu a oligomerizaci Fas receptorů, kdy se formuje komplex DISC, interakce mezi nimi nenastávají volně v cytoplasmě (Scaffidi et al., 1999). Až ve chvíli, kdy se protein FADD naváže pomocí DD domény na receptor smrti, uvolní se jeho DED doména, která je následně schopná vázat kaspázu 8 a protein c-FLIP.

Zajímavé je, že se c-FLIP a kaspáza 8 preferenčně váží na různé strany DED domény proteinu FADD. Zatímco c-FLIP se přednostně váže na povrch $\alpha 1/\alpha 4$ helixů, kaspáza 8 snadněji interaguje s povrchem $\alpha 2/\alpha 5$ helixů proteinu FADD. Tyto rozdílné vazebné preference jsou příčinou toho, že se protein c-FLIP váže do komplexu DISC s větší afinitou než prokaspáza 8. To vysvětluje, proč může být množství proteinu c-FLIP v komplexu DISC srovnatelné s množstvím prokaspázy 8 i přesto, že je jeho cytoplazmatická koncentrace mnohem nižší (Majkut et al., 2014).

Je třeba také zmínit, že přítomnost proteinu c-FLIP v komplexu DISC nevylučuje přítomnost další molekuly tohoto proteinu (Krueger et al., 2001). Avšak vznik homodimeru proteinu c-FLIP v komplexu DISC je velmi nepravděpodobný (Majkut et al., 2014).

Interakce s kaspázou 8:

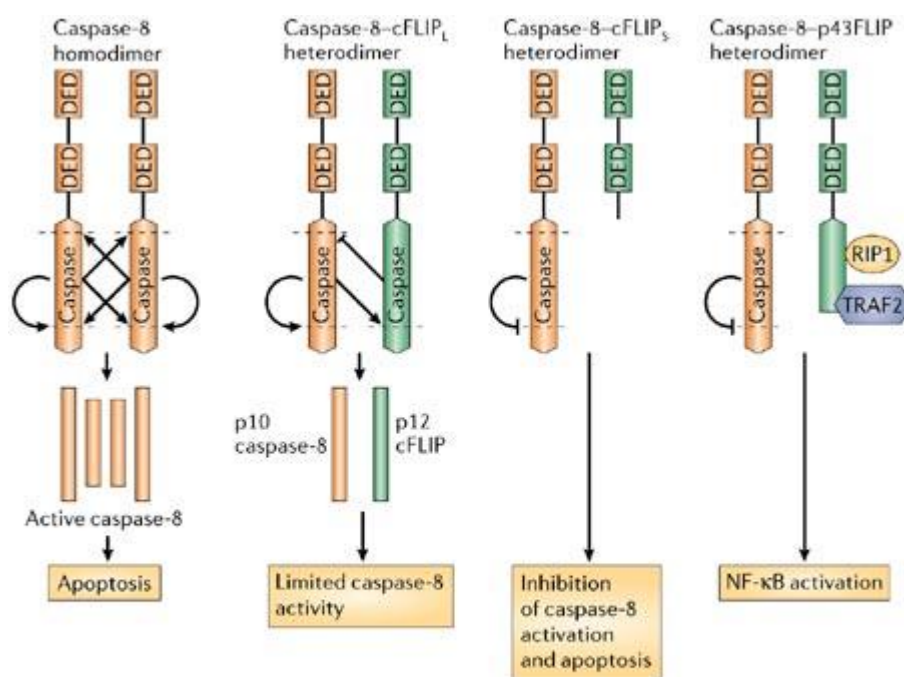
Vazba kaspázy 8 s proteinem c-FLIP v komplexu DISC je opět zprostředkována DED doménami těchto proteinů. Konkrétně k interakcím dochází mezi $\alpha 1/\alpha 4$ helixy DED1 domény proteinu c-FLIP a $\alpha 2/\alpha 5$ helixy DED2 domény kaspázy 8 (Majkut et al., 2014).

S ohledem na různé izoformy proteinu c-FLIP dochází k formování několika různých dimerů: může vznikat heterodimer prokaspáza-8/c-FLIP_L, heterodimer prokaspáza-8/c-FLIP_{S/R}, nebo homodimer prokaspáz 8 (Obr. 7). V případě heterodimeru prokaspáza-8/c-FLIP_L dochází kromě interakcí mezi DED doménami ještě navíc k interakci CLD domény proteinu c-FLIP_L s kaspázovou doménou kaspázy 8 (Shu et al., 1997; Irmeler et al., 1997). Tuto interakci zprostředkovávají antiparalelně orientované $\beta 6$ -listy obou proteinů, mezi kterými se vytvoří 8 vodíkových můstků. Interakce mezi kaspázovými doménami v homodimeru prokaspáz 8 je obdobná, avšak tvoří se zde pouze 4 vodíkové můstky. Další interakcí je také kontakt N-konce CLD domény proteinu c-FLIP_L s $\alpha 4/\alpha 5$ -helixy kaspázy 8 (Yu et al., 2009).

Štěpení proteinu c-FLIP_L v komplexu DISC:

Při vzniku heterodimeru prokaspáza-8/c-FLIP_{S/R} nedochází k žádnému autokatalytickému štěpení, zatímco heterodimer prokaspáza-8/c-FLIP_L se štěpí a vzniká aktivní p43/41-kaspáza 8/p43-FLIP_L heterodimer (Obr. 7) (Fricker et al., 2010).

Štěpení obou proteinů probíhá velmi rychle, a tak jsou v komplexech DISC detekovatelné téměř jenom p43 fragmenty proteinu c-FLIP_L (Chang et al., 2002). c-FLIP_L je pro kaspázu 8 preferovaným substrátem, a tak k jeho štěpení dochází dříve než ke štěpení prokaspázy 8. Štěpený c-FLIP_L navíc ještě zvyšuje proteolytickou aktivitu kaspázy 8 ve srovnání s neštěpenou formou (Yu et al., 2009). Jak u kaspázy 8, tak i u proteinu c-FLIP probíhá štěpení mezi malou a velkou podjednotkou kaspázové/CLD domény, což vede ke vzniku heterodimeru p43-kaspáza 8/p43 c-FLIP_L, malé podjednotky kaspázy 8 (p10) a malé podjednotky proteinu c-FLIP_L (p12) (Krueger et al., 2001). K oddělení malé a velké podjednotky v proteinu c-FLIP_L dochází za aminokyselinou Asp376, prokaspáza 8 je autokatalyticky štěpena za Asp374 (Micheau et al., 2002). Po štěpení vzniká ještě silnější vazba mezi proteinem c-FLIP_L a kaspázou 8, která brání dalšímu štěpení a aktivaci kaspázy 8 (Irmeler et al., 1997).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Obrázek 7: **Interakce kaspázy 8 a proteinu c-FLIP.** Přítomnosti různých izoform proteinu c-FLIP v dimeru s kaspázou 8 ovlivňuje aktivaci kaspázy 8, apoptózu a aktivaci transkripčního faktoru NF-κB. Převzato z (Budd et al., 2006).

Proapoptotická funkce c-FLIP_L:

Pro proapoptotickou funkci proteinu c-FLIP_L je nezbytná jeho CLD doména (192-480 aa). Díky ní dochází v komplexu DISC ke štěpení kaspázy 8 a proteinu c-FLIP_L.

Proapoptotická funkce proteinu c-FLIP_L spočívá v tom, že urychluje odštěpení malých podjednotek (p10 a p12) od vzniklého p43/41-kaspáza 8/p43 FLIP heterodimeru. Tuto schopnost proteinu c-FLIP_L však snižuje přítomnost krátkých izoform c-FLIP_{S/R} (Fricker et al., 2010).

Podstatou aktivace kaspázy 8 proteinem c-FLIP_L je vytvoření vodíkových můstků mezi Asn407 a Asn408 prokaspázy 8 a Arg337 a His395 proteinu c-FLIP_L. Tyto vodíkové můstky, které se nevyskytují v homodimeru prokaspáz 8, stabilizují aktivní konformaci prokaspázy 8. Aminokyseliny Asn407 a Asn408 jsou součástí aktivační smyčky obsahující také důležitý arginin vytvářející kapsu, do které se váže postranní řetězec kyseliny asparagové cílového substrátu. Dojde-li k interakci prokaspázy 8 a proteinu c-FLIP_L, aktivační smyčka se posune, vytvoří se vodíkové můstky a prokaspáza se stává aktivní. Následně se

autoprocisivně štěpí za Asp374 mezi malou a velkou podjednotkou. Štěpením vzniká nový C-konec, který je poté v nové poloze stabilizován solným můstkem s Lys224 v případě homodimeru kaspázy 8 a Arg243 v případě heterodimeru kaspázy 8/c-FLIP_L. Tyto solné můstky stabilizují aktivní konformaci kaspázy 8 (Micheau et al., 2002).

Produkty (heterodimer p43/41-kaspázy 8/p43-FLIP_L, p43/p41-kaspázy-8 homodimer a (p10/p18)₂ heterotetramer), které vznikly štěpením dimeru v komplexu DISC, pak vedou k apoptóze. Účinnost těchto aktivních komplexů není totožná, p43/p41-kaspázy 8 homodimer štěpí substráty asi pětikrát účinněji než p43/p41-kaspázy 8/p43-FLIP_L heterodimer a je zároveň také účinnější než (p10/p18)₂ heterotetramer (Fricker et al., 2010).

Antiapoptotická funkce c-FLIP_L:

Při vzniku heterodimeru prokaspázy 8/c-FLIP_L dochází ke štěpení obou proteinů, avšak poté zůstává štěpený heterodimer pevně vázán v komplexu DISC a zabraňuje výměně štěpené kaspázy 8 za dosud neaktivovanou prokaspázu 8. K inhibici apoptózy však vede pouze vyšší množství proteinu c-FLIP_L, které zablokuje dostatek DISC komplexů, takže nedochází k aktivaci a transformaci dalších prokaspáz 8 na aktivní enzymy (Scaffidi et al., 1999). Když je indukce apoptózy silná, proteiny c-FLIP jsou navázány v DISC komplexech a na povrch $\alpha 1/\alpha 4$ helixů DED domény proteinu FADD ve zbývajících volných komplexech DISC se dále navazují prokaspázy 8. Takto vznikají homodimery prokaspázy 8, projdou konformační změnou a autokatalyticky se aktivují (Majkut et al., 2014).

Regulace funkce c-FLIP_L:

Výsledek působení proteinu c-FLIP_L na aktivaci prokaspázy 8 závisí na jeho koncentraci v komplexu DISC, ale také na buněčném typu a na síle stimulace receptorů smrti. Apoptózu může c-FLIP_L buď inhibovat, nebo naopak zvyšovat její účinnost. Tuto závislost vysvětluje Fricker et al. v matematickém modelu aktivace kaspázy 8 v komplexu DISC (Fricker et al., 2010). Tím také objasňuje dřívější protichůdné názory na funkci proteinu c-FLIP_L.

Úloha proteinu c-FLIP_L v komplexu DISC je následující: c-FLIP_L se do komplexu DISC váže s větší afinitou než prokaspázy 8, jejich poměry v cytoplazmě a v komplexu DISC se proto liší. V komplexu DISC pak probíhá štěpení obou proteinů. Důležité je, že štěpení

probíhá rychleji v heterodimerech prokaspáza 8/c-FLIP_L než homodimerech prokaspázy 8. Přítomnost c-FLIP_L v komplexu DISC urychluje první krok aktivace prokaspázy 8. Ke druhému kroku už ale v heterodimerech prokaspáza 8/c-FLIP_L nedochází a ty navíc zůstávají díky vysoké afinitě c-FLIP_L, vázané v komplexu DISC a tím blokují místo pro aktivaci dalších prokaspáz 8.

Proapoptoticky c-FLIP_L působí v případě, že je jeho exprese poměrně nízká a zároveň dochází k vysoké stimulaci receptorů smrti. Pokud je množství krátkých izoform c-FLIP_{S/R} vysoké, c-FLIP_L ruší jejich antiapoptotické působení a také vykazuje proapoptotické účinky. Při vysoké expresi c-FLIP_L a nízké koncentraci ligandu DR, c-FLIP_L snižuje aktivaci prokaspázy 8 a má antiapoptotický účinek.

Stejné množství c-FLIP_L může vést jak k apoptóze (při velkém množství Fas ligandu), tak i k potlačení buněčné smrti (při nižší stimulaci Fas receptoru). Výsledek působení proteinu c-FLIP_L v komplexu DISC závisí na množství tohoto regulátoru a stejně tak i na síle stimulace receptoru smrti v tomto komplexu (Fricker et al., 2010).

Antiapoptotická funkce c-FLIP_S a c-FLIP_R:

Na rozdíl od heterodimeru prokaspáza 8/c-FLIP_L, kdy dochází alespoň k prvnímu kroku štěpení vedoucího k aktivaci kaspázy 8, je při interakci prokaspázy 8 s proteinem c-FLIP_S stejně tak jako c-FLIP_R štěpení kompletně blokováno. Při navázání krátké izoformy c-FLIP_{S/R} totiž nedochází v důsledku ztráty CLD domény k další interakci s kaspázou 8. A tím pádem nedochází ani ke konformačním změnám a prokaspáza 8 zůstává katalyticky neaktivní a neštěpená. Lze předpokládat, že proteiny c-FLIP_S a c-FLIP_R mají totožné funkce (Fricker et al., 2010). Nejen že se obě izoformy váží do komplexu DISC se srovnatelnou afinitou, ale také zabraňují apoptóze se stejnou účinností (Golks et al., 2005). Navíc při velmi vysoké expresi proteinu c-FLIP blokuje krátká izoforma c-FLIP_S také štěpení dlouhé izoformy c-FLIP_L v komplexu DISC (Krueger et al., 2001). V případě apoptózy spuštěné ligandem TRAIL je jejím hlavním inhibítozem c-FLIP_S, který je také zodpovědný za rezistenci některých buněčných linií k působení ligandu TRAIL (Bin et al., 2001).

8) Funkce proteinu c-FLIP v nekroptóze:

Regulovaná nekroza či nekroptóza může být iniciovaná signalizací z různých receptorů. Zatím bylo zjištěno, že protein c-FLIP reguluje nekroptózu indukovanou ligandy receptorů smrti (TNFR1 a FasR), či ligandy některých Toll like receptorů (TLR) (Obr. 8).

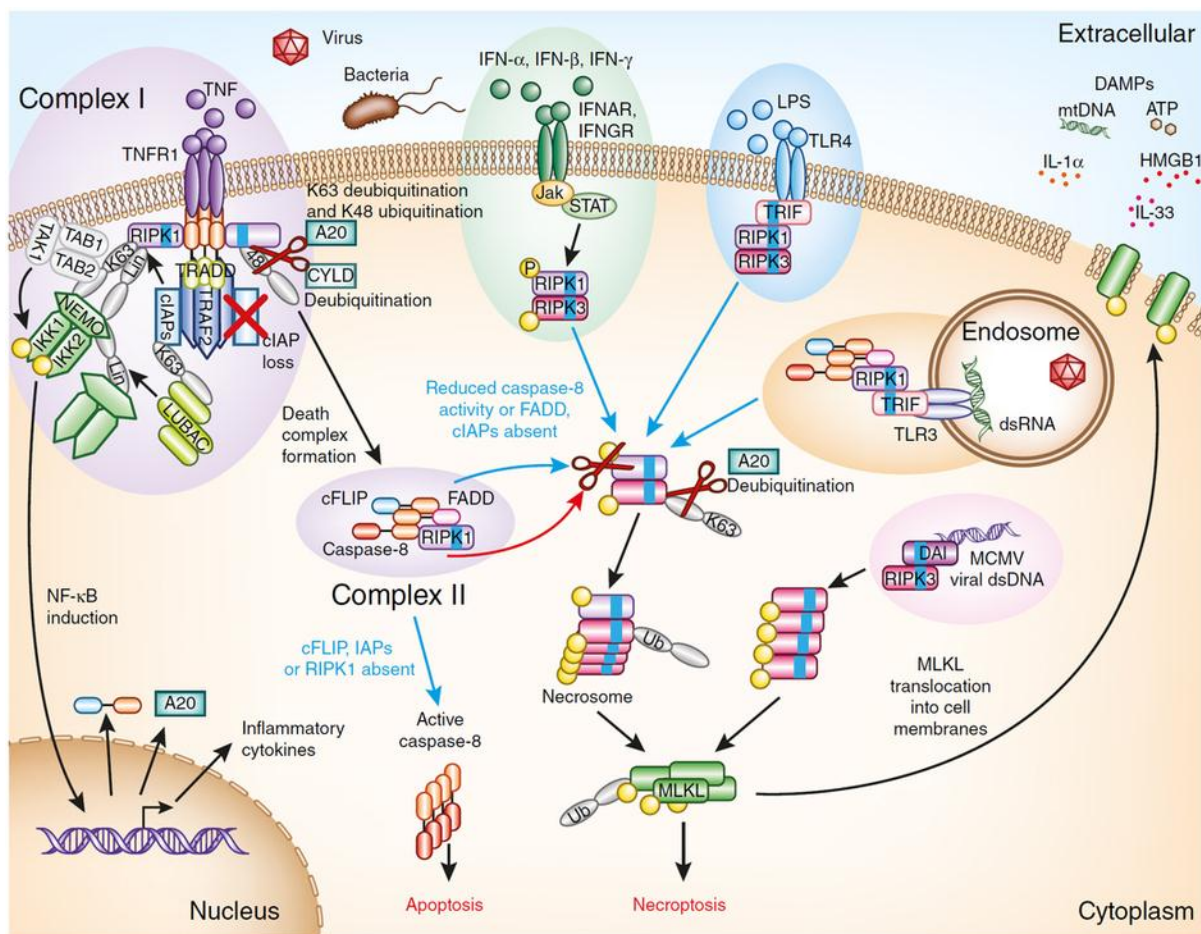
Nekroptóza indukovaná ligandy TNF a FasL:

Při aktivaci signalizace z receptoru TNFR1 se vazbou ligandu TNF na tomto receptoru formuje nejprve komplex I, který se posléze může oddělit a podílet se na vzniku komplexu II. Signálem pro vytvoření komplexu II je deubiquitinace kinázy RIPK1, která je příčinou disociace RIPK1 od membrány a vytvoření komplexu II v cytosolu. Komplex II je křížovatkou mezi apoptózou a nekroptózou. Jeho součástí jsou proteiny TRADD, FADD, RIPK1, RIPK3 a kaspáza 8. Kaspáza 8 se v komplexu II může aktivovat a následně štěpit RIPK1 a RIPK3. Tím za prvé předchází nekroptóze, a za druhé se může z komplexu II uvolnit a jako aktivní enzym iniciovat apoptózu. Aktivace a uvolnění kaspázy 8 z komplexu II je regulováno proteinem c-FLIP. Pokud kaspáza 8 v komplexu II schází, nebo je inhibována, vede stimulace TNFR ke vzniku nekrozomu a s ním spojené nekroptotické buněčné smrti (Vanlangenakker et al., 2011).

V souvislosti s TNF-indukovanou nekroptózou byl zatím zkoumán pouze vliv dlouhé izoformy c-FLIP_L. Heterodimer kaspáza 8/c-FLIP_L v komplexu II brání jak apoptóze, tak nekroptóze. Jelikož heterodimer kaspáza 8/c-FLIP_L je proteolyticky aktivní, je možné, že podobně jako homodimer kaspázy 8, štěpí kinázy RIPK1 a RIPK3, což vede k rozpadu jimi tvořeného komplexu. Zároveň však c-FLIP_L brání kompletní aktivaci kaspázy 8. c-FLIP_L tak má současně antiapoptotickou i antinekroptotickou funkci (Oberst et al., 2011; Vanlangenakker et al., 2011).

Role krátké izoformy c-FLIP_S byla zkoumána u FasL-indukované buněčné smrti. Obdobně jako TNFR1 dochází v důsledku vazby FasL na Fas receptor ke vzniku komplexu I a II. c-FLIP_S v komplexu II blokuje aktivaci kaspázy 8, avšak na rozdíl od c-FLIP_L nepotlačuje navázání RIPK1 do tohoto komplexu. c-FLIP_S má tak pouze antiapoptotickou funkci, avšak buněčné smrti nezabrání, jelikož není schopen blokovat nekroptózu (Geserick et al., 2009). To je v souladu s poznatkem, že heterodimer kaspáza 8/c-FLIP_S není proteolyticky aktivní, tudíž nemůže štěpit RIPK1 a RIPK3 a zabránit vzniku nekrozomu. Naproti tomu c-FLIP_L

proteolytickou aktivitu kaspázy 8 neinhibuje a potlačuje tak nekroptózu indukovanou FasL (He and He, 2013).



Obrázek 8: **Mechanismy aktivace RIPK1/RIPK3 indukované nekroptózy z TNFR a TLR receptorů.** Převzato z (Silke et al., 2015).

Ripoptozom:

Dalším komplexem na rozhraní apoptózy a nekroptózy je ripoptozom. I v tomto případě rozhoduje o osudu buňky protein c-FLIP. Ripoptozom je 2 MDa intracelulární komplex vznikající v důsledku genotoxického stresu při ztrátě IAP proteinů. Podobně jako komplex II obsahuje proteiny RIPK1, FADD a kaspázu 8, případně kaspázu 10. Vzniká však nezávisle na TNF, FasL i ligandu TRAIL a tudíž ho od komplexu II musíme odlišit. Složení ripoptozomu vyžaduje aktivní RIPK1 kinázu. Obdobně jako komplex II, může ripoptozom spustit apoptotické i nekroptotické signální dráhy v závislosti na dalších okolnostech.

Utváření ripoptozomu inhibují proteiny cIAP1, cIAP2, XIAP a také protein c-FLIP (Obr. 9). Následkem asociace kaspázy 8 s proteinem c-FLIP_L dochází ke štěpení RIPK1

The diagram illustrates the regulation of RIPK1 activity and the formation of the ripoptosome complex, leading to different cell death pathways based on the levels of FLIP.

Cytosol:

- RIPK1:** Consists of a Kinase domain (orange) and a Death Domain (DD, blue).
- RHIM:** Consists of a Kinase domain (orange) and a Homophilic Interaction Motif (RHIM, blue).
- Stress signal:** Activates RIPK1.
- Deubiquitylation:** Involves SMs (SUMO1) and IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) acting on Ub (Ubiquitin).
- Ripoptosome:** A complex of proteins including FADD (blue), Caspase 8 (green), p18 (green), p10 (purple), p12 (purple), and FLIP_L (purple).

Endosomal lumen:

- TLR3:** Toll-like receptor 3, which recognizes Poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid).
- TRIF:** MyD88-independent 1, which is involved in the signaling pathway.
- TRIF-RIPK1 and RHIM-RHIM interactions:** These interactions lead to the recruitment of RIPK1 to the endosomal membrane.

Cell Death Pathways:

- No FLIP:** In the absence of FLIP, the ripoptosome complex leads to **Apoptosis**.
- High levels of FLIP_L:** High levels of FLIP_L lead to **RIPK1 cleavage** and **Disassembly of the ripoptosome**, resulting in **Survival**.
- High level of FLIP_S:** High levels of FLIP_S lead to **RIPK1 cleavage** and **Disassembly of the ripoptosome**, resulting in **Necroptosis**.

V případě že kaspáza 8 není v ripoptozomu inhibována proteinem c-FLIP, ani jiným způsobem, dochází k její autokatalytické aktivaci a apoptóze. V přítomnosti c-FLIP_L je kaspáza 8 částečně aktivní, štěpí protein RIPK1, blokuje nekroptózu, avšak apoptózu nespouští. c-FLIP_S v ripoptozomu inhibuje aktivaci kaspázy 8, což vede k nekroptóze. Převzato z (Blander, 2014).

9) Další funkce proteinu c-FLIP:

Kromě regulace apoptózy a nekroptózy ovlivňuje protein c-FLIP také některé proliferační, cytoprotektivní a jiné buněčné mechanizmy. Podílí se např. na regulaci NF- κ B, ERK, Akt a JNK signalizačních drah (Safa, 2012), inhibuje autofagii (Lee et al., 2009) a je zapojen také v regulaci Wnt signalizační dráhy. V nedávné době bylo také publikováno, že c-FLIP obsahuje jaderný lokalizační (NLS) a exportní signál (NES) a v souvislosti s tím reguluje právě např. Wnt signalizaci (Katayama et al., 2010). Nejnovějším překvapivým poznatkem pak je, že c-FLIP v závislosti na proapoptotickém BH3-only proteinu Bim z rodiny Bcl-2 reguluje také vnitřní apoptotickou dráhu (He and He, 2015). Nedávné objevy ukazují, že zdaleka ne všechny funkce proteinu c-FLIP jsou nám známy a další výzkum může přinést velmi zajímavé výsledky.

10) Klinický význam proteinu c-FLIP a jeho potenciální využití v léčbě rakoviny:

Defekty v regulaci apoptózy a nekroptózy jsou příčinou mnoha závažných onemocnění. Vzhledem k tomu, že protein c-FLIP komplexně reguluje tyto esenciální buněčné děje, musí být jeho exprese důsledně regulována. Zvýšené množství proteinu c-FLIP je spojeno s mnohými nádorovými onemocněními (např. karcinomem tlustého střeva, žaludku, slinivky, vaječníků, prostaty nebo melanomem). Ve většině případů je zvýšená exprese izoformy c-FLIP_L, avšak u karcinomu žaludku a slinivky je zvýšené množství izoformy c-FLIP_S. Nádory exprimující nadměrné množství proteinu c-FLIP jsou často rezistentní k léčbě cílené na TNFR receptory (např. TRAIL), i k jiné chemoterapeutické léčbě. Snížení exprese proteinu c-FLIP zvyšuje citlivost nádorů k této léčbě. Regulace exprese proteinu c-FLIP je potenciálním cílem protinádorové léčby, která navíc může zvýšit úspěšnost léčby rezistentních nádorů (Shirley and Micheau, 2013).

Závěr:

Hlavní role proteinu c-FLIP spočívá v regulaci programované buněčné smrti – apoptózy a nekroptózy, a je úzce propojená s funkcí sekvenčně i strukturně příbuzné kaspázy 8. Protein c-FLIP může apoptózu i nekroptózu potlačovat, ale také podporovat. Efekt působení proteinu c-FLIP závisí na jeho množství, typu převažující izoformy, jeho posttranslačních modifikacích i na buněčném kontextu. V této práci jsem shrnula dosud známé mechanismy regulace apoptózy a nekroptózy proteinem c-FLIP a také neméně důležité regulátory exprese a množství samotného proteinu c-FLIP. Hlubší objasnění těchto mechanismů a jejich regulace může mít velký význam ve výzkumu a vývoji nových protinádorových terapeutik.

Seznam použité literatury:

- Abedini, M.R., E.J. Muller, J. Brun, R. Bergeron, D. a. Gray, and B.K. Tsang. 2008. Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells. *Cancer Research*. 68:4511–4517. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0673.
- Aoudjit, F., and K. Vuori. 2001. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: A role for c-Flip and implications for anoikis. *Journal of Cell Biology*. 153:633–643. doi:10.1083/jcb.152.3.633.
- Bartke, T., D. Siegmund, N. Peters, M. Reichwein, F. Henkler, P. Scheurich, and H. Wajant. 2001. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene*. 20:571–580. doi:10.1038/sj.onc.1204124.
- Vanden Berghe, T., A. Linkermann, S. Jouan-Lanhuet, H. Walczak, and P. Vandenabeele. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:135–47. doi:10.1038/nrm3737.
- Bertin, J., R.C. Armstrong, S. Otilie, D. a Martin, Y. Wang, S. Banks, G.H. Wang, T.G. Senkevich, E.S. Alnemri, B. Moss, M.J. Lenardo, K.J. Tomaselli, and J.I. Cohen. 1997. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:1172–1176. doi:10.1073/pnas.94.4.1172.
- Bin, L., X. Li, L.-G. Xu, and H.-B. Shu. 2001. The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 510:37–40. doi:10.1016/S0014-5793(01)03222-7.
- Blander, J.M. 2014. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Reviews Immunology*. 14:601–618. doi:10.1038/nri3720.
- Bleumink, M., R. Köhler, M. Giaisi, P. Proksch, P.H. Krammer, and M. Li-Weber. 2011. Rocaglamide breaks TRAIL resistance in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma by translational suppression of c-FLIP expression. *Cell death and differentiation*. 18:362–370. doi:10.1038/cdd.2010.99.
- Boatright, K.M., C. Deis, J.-B. Denault, D.P. Sutherlin, and G.S. Salvesen. 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *The Biochemical journal*. 382:651–657. doi:10.1042/BJ20040809.
- Borrelli, S., E. Candi, D. Alotto, C. Castagnoli, G. Melino, M. a Viganò, and R. Mantovani. 2009. p63 regulates the caspase-8-FLIP apoptotic pathway in epidermis. *Cell death and differentiation*. 16:253–263. doi:10.1038/cdd.2008.147.
- Budd, R.C., W.-C. Yeh, and J. Tschopp. 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature reviews. Immunology*. 6:196–204. doi:10.1038/nri1787.
- Clarke, P.G.H., and S. Clarke. 2012. Nineteenth century research on cell death. *Experimental Oncology*. 34:139-145.

- Cornforth, a N., J.S. Davis, E. Khanifar, K.L. Nastiuk, and J.J. Krolewski. 2008. FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*. 27:4422–4433. doi:10.1038/onc.2008.80.
- Djerbi, M., T. Darreh-Shori, B. Zhivotovsky, and a. Grandien. 2001. Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different FLIP isoforms. *Scandinavian Journal of Immunology*. 54:180–189. doi:10.1046/j.1365-3083.2001.00941.x.
- Eckhart, L., C. Ballaun, M. Hermann, J.L. VandeBerg, W. Sipos, A. Uthman, H. Fischer, and E. Tschachler. 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular Biology and Evolution*. 25:831–841. doi:10.1093/molbev/msn012.
- Eimon, P.M., E. Kratz, E. Varfolomeev, S.G. Hymowitz, H. Stern, J. Zha, and a Ashkenazi. 2006. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell death and differentiation*. 13:1619–1630. doi:10.1038/sj.cdd.4402015.
- Ellis, H.M., and R.H. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 44:817–829. doi:10.1016/0092-8674(86)90004-8.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 35:495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
- Feoktistova, M., P. Geserick, B. Kellert, D.P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Häcker, and M. Leverkus. 2011. CIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell*. 43:449–463. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.011.
- Fricker, N., J. Beaudouin, P. Richter, R. Eils, P.H. Krammer, and I.N. Lavrik. 2010. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *Journal of Cell Biology*. 190:377–389. doi:10.1083/jcb.201002060.
- Fukazawa, T., T. Fujiwara, F. Uno, F. Teraishi, Y. Kadowaki, T. Itoshima, Y. Takata, S. Kagawa, J. a Roth, J. Tschopp, and N. Tanaka. 2001. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene*. 20:5225–5231. doi:10.1038/sj.onc.1204673.
- Galluzzi, L., J.M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S. a Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, E.S. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, E.H. Baehrecke, N.G. Bazan, M.J. Bertrand, K. Bianchi, M. V Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D.E. Bredesen, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, F. Cecconi, F.K. Chan, N.S. Chandel, E.H. Cheng, J.E. Chipuk, J. a Cidlowski, a Ciechanover, T.M. Dawson, V.L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, N. Di Daniele, V.M. Dixit, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, G.M. Fimia, R. a Flavell, S. Fulda, C. Garrido, M.-L. Gougeon, D.R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, M.O. Hengartner, H. Ichijo, B. Joseph, P.J. Jost, T. Kaufmann, O. Kepp, D.J. Klionsky, R. a Knight, S. Kumar, J.J. Lemasters, B. Levine, a Linkermann, S. a Lipton, R. a Lockshin, C. López-Otín, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J.-C. Marine, S.J. Martin, J.-C. Martinou, J.P. Medema, P. Meier, S. Melino, N. Mizushima, U. Moll, C. Muñoz-Pinedo, G. Nuñez, a Oberst, T. Panaretakis, J.M. Penninger, M.E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J.H. Prehn, H. Puthalakath, G. a Rabinovich, K.S. Ravichandran, R. Rizzuto, C.M. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, Y. Shi, H.-U. Simon, B.R. Stockwell, G. Szabadkai, S.W. Tait, H.L. Tang, N. Tavernarakis, Y. Tsujimoto, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, et al. 2014. Essential versus accessory aspects

- of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*. 22:58–73. doi:10.1038/cdd.2014.137.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M. V Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R. a Knight, S. Kumar, S. a Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.-U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 19:107–120. doi:10.1038/cdd.2011.96.
- Ganapathy, M., R. Ghosh, X. Jianping, X. Zhang, R. Bedolla, J. Schoolfield, I.T. Yeh, D. a. Troyer, A.F. Olumi, and A.P. Kumar. 2009. Involvement of FLIP in 2-methoxyestradiol-induced tumor regression in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Clinical Cancer Research*. 15:1601–1611. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1389.
- Gao, S., P. Lee, H. Wang, W. Gerald, M. Adler, L. Zhang, Y.-F. Wang, and Z. Wang. 2005. The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Molecular endocrinology*. 19:1792–1802. doi:10.1210/me.2004-0445.
- Gao, S., H. Wang, P. Lee, J. Melamed, C.X. Li, F. Zhang, H. Wu, L. Zhou, and Z. Wang. 2006. Androgen receptor and prostate apoptosis response factor-4 target the c-FLIP gene to determine survival and apoptosis in the prostate gland. *Journal of Molecular Endocrinology*. 36:463–483. doi:10.1677/jme.1.01991.
- Geserick, P., M. Hupe, M. Moulin, W.W.L. Wong, M. Feoktistova, B. Kellert, H. Gollnick, J. Silke, and M. Leverkus. 2009. Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *Journal of Cell Biology*. 187:1037–1054. doi:10.1083/jcb.200904158.
- Golks, A., D. Brenner, C. Fritsch, P.H. Krammer, and I.N. Lavrik. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 280:14507–14513. doi:10.1074/jbc.M414425200.
- Goltsev, Y. V., A. V. Kovalenko, E. Arnold, E.E. Varfolomeev, V.M. Brodianskii, and D. Wallach. 1997. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *Journal of Biological Chemistry*. 272:19641–19644. doi:10.1074/jbc.272.32.19641.
- Hadano, S., Y. Yanagisawa, J. Skaug, K. Fichter, J. Nasir, D. Martindale, B.F. Koop, S.W. Scherer, D.W. Nicholson, G. a Rouleau, J. Ikeda, and M.R. Hayden. 2001. Cloning and characterization of three novel genes, ALS2CR1, ALS2CR2, and ALS2CR3, in the juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) critical region at chromosome 2q33-q34: candidate genes for ALS2. *Genomics*. 71:200–213. doi:10.1006/geno.2000.6392.
- Han, D.K., P.M. Chaudhary, M.E. Wright, C. Friedman, B.J. Trask, R.T. Riedel, D.G. Baskin, S.M. Schwartz, and L. Hood. 1997. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:11333–11338. doi:10.1073/pnas.94.21.11333.
- He, M.-X., and Y.-W. He. 2013. A role for c-FLIP(L) in the regulation of apoptosis, autophagy, and necroptosis in T lymphocytes. *Cell death and differentiation*. 20:188–97. doi:10.1038/cdd.2012.148.

- He, M.-X., and Y.-W. He. 2015. c-FLIP Protects T Lymphocytes from Apoptosis in the Intrinsic Pathway. *The Journal of Immunology*. 194:3444–3451. doi:10.4049/jimmunol.1400469.
- Higuchi, H., J.H. Yoon, A. Grambihler, N. Werneburg, S.F. Bronk, and G.J. Gores. 2003. Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 278:454–461. doi:10.1074/jbc.M209387200.
- Hu, S., C. Vincenz, M. Buller, and V.M. Dixit. 1997a. A Novel Family of Viral Death Effector Domain-containing Molecules That Inhibit Both CD-95- and Tumor Necrosis Factor Receptor-1-induced Apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 272:9621–9624.
- Hu, S., C. Vincenz, J. Ni, R. Gentz, and V.M. Dixit. 1997b. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 272:17255–17257. doi:10.1074/jbc.272.28.17255.
- Hu, W., H. Johnson, and H.-B. Shu. 2000. Activation of NF-kappa B by FADD, Casper, and Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*. 275:10838–10844. doi:10.1074/jbc.275.15.10838.
- Hughes, M. a., N. Harper, M. Butterworth, K. Cain, G.M. Cohen, and M. MacFarlane. 2009. Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. *Molecular Cell*. 35:265–279. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.012.
- Hwang, E.Y., M.S. Jeong, S.Y. Park, and S.B. Jang. 2013. Evidence of complex formation between FADD and c-FLIP death effector domain. *Biochemistry and molecular biology reports*. 47:488–493. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.9.239.
- Chang, D.W., Z. Xing, V.L. Capacio, M.E. Peter, and X. Yang. 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO Journal*. 22:4132–4142. doi:10.1093/emboj/cdg414.
- Chang, D.W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B.C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M.E. Peter, and X. Yang. 2002. C-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO Journal*. 21:3704–3714. doi:10.1093/emboj/cdf356.
- Chang, L., H. Kamata, G. Solinas, J.L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y.C. Liu, and M. Karin. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIPL turnover. *Cell*. 124:601–613. doi:10.1016/j.cell.2006.01.021.
- Chanvorachote, P., U. Nimmannit, L. Wang, C. Stehlik, B. Lu, N. Azad, and Y. Rojanasakul. 2005. Nitric oxide negatively regulates Fas CD95-induced apoptosis through inhibition of ubiquitin-proteasome-mediated degradation of FLICE inhibitory protein. *Journal of Biological Chemistry*. 280:42044–42050. doi:10.1074/jbc.M510080200.
- Chauhan, L., G.D. Jenkins, N. Bhise, T. Feldberg, T. Mitra-Ghosh, B.L. Fridley, and J.K. Lamba. 2015. Genome-wide association analysis identified splicing single nucleotide polymorphism in CFLAR predictive of triptolide chemo-sensitivity. *BMC Genomics*. 16:483. doi:10.1186/s12864-015-1614-1.
- Chen, F., H.-H. Zhu, L.-F. Zhou, S.-S. Wu, J. Wang, and Z. Chen. 2010a. Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to Taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports*. 25:223–230. doi:10.3892/or.

- Chen, L.-C., I.-C. Chung, C. Hsueh, N.-M. Tsang, L.-M. Chi, Y. Liang, C.-C. Chen, L.-J. Wang, and Y.-S. Chang. 2010b. The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients. *Cell death and differentiation*. 17:1463–1473. doi:10.1038/cdd.2010.24.
- Inohara, N., T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, and G. Núñez. 1997. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:10717–10722. doi:10.1073/pnas.94.20.10717.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schröter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 388:190–195. doi:10.1038/40657.
- Jones, B.A., Y.P. Rao, R.T. Stravitz, and G.J. Gores. 1997. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*. 272:G1109–G1115.
- Kataoka, T., R.C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsics, and J. Tschopp. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Current Biology*. 10:640–648. doi:10.1016/S0960-9822(00)00512-1.
- Katayama, R., T. Ishioka, S. Takada, R. Takada, N. Fujita, T. Tsuruo, and M. Naito. 2010. Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L. *Journal of cell science*. 123:23–28. doi:10.1242/jcs.058602.
- Kaunisto, A., V. Kochin, T. Asaoka, A. Mikhailov, M. Poukkula, A. Meinander, and J. Eriksson. 2001. PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. *Cell death and differentiation*. 7:255–260. doi:10.1038/cdd.2009.35.
- Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *British journal of cancer*. 239:239–257. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews. Immunology*. 7:532–542. doi:10.1038/nri2115.
- Kreuz, S., D. Siegmund, P. Scheurich, and H. Wajant. 2001. NF- κ B Inducers Upregulate cFLIP, a Cycloheximide-Sensitive Inhibitor of Death Receptor Signaling. *Molecular and cellular biology*. 21:3964–3973. doi:10.1128/MCB.21.12.3964.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. Alnemri, E. Baehrecke, M. Blagosklonny, W. El-Deiry, P. Golstein, D. Green, M. Hengartner, R. Knight, S. Kumar, S. a Lipton, W. Malorni, G. Núñez, M. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. Classification of Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 16:3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.Classification.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 276:20633–20640. doi:10.1074/jbc.M101780200.

- Kumar, S., B.J. van Raam, G.S. Salvesen, and P. Cieplak. 2014. Caspase Cleavage Sites in the Human Proteome: CaspDB, a Database of Predicted Substrates. *PLoS ONE*. 9:e110539. doi:10.1371/journal.pone.0110539.
- Kundu, M., S.K. Pathak, K. Kumawat, S. Basu, G. Chatterjee, S. Pathak, T. Noguchi, K. Takeda, H. Ichijo, C.B.F. Thien, W.Y. Langdon, and J. Basu. 2009. A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. *Nature immunology*. 10:918–926. doi:10.1038/ni.1754.
- Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer. 2005. Death receptor signaling. *Journal of cell science*. 118:265–267. doi:10.1242/jcs.01610.
- Lee, J.-S., Q. Li, J.-Y. Lee, S.-H. Lee, J.H. Jeong, H.-R. Lee, H. Chang, F.-C. Zhou, S.-J. Gao, C. Liang, and J.U. Jung. 2009. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nature cell biology*. 11:1355–1362. doi:10.1038/ncb1980.
- Li, F.Y., P.D. Jeffrey, J.W. Yu, and Y. Shi. 2006. Crystal structure of a viral FLIP: Insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 281:2960–2968. doi:10.1074/jbc.M511074200.
- Li, W., X. Zhang, and A.F. Olumi. 2007. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Research*. 67:2247–2255. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3793.
- Mahalingam, D., a Natoni, M. Keane, a Samali, and E. Szegezdi. 2010. Early growth response-1 is a regulator of DR5-induced apoptosis in colon cancer cells. *British journal of cancer*. 102:754–764. doi:10.1038/sj.bjc.6605545.
- Majkut, J., M. Sgobba, C. Holohan, N. Crawford, a E. Logan, E. Kerr, C. a Higgins, K.L. Redmond, J.S. Riley, I. Stasik, D. a Fennell, S. Van Schaeybroeck, S. Haider, P.G. Johnston, D. Haigh, and D.B. Longley. 2014. Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD's DED binding surfaces regulates DISC assembly. *Nature communications*. 5:3350. doi:10.1038/ncomms4350.
- Merdzhanova, G., V. Edmond, S. De Seranno, a Van den Broeck, L. Corcos, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri, and B. Eymin. 2008. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell death and differentiation*. 15:1815–1823. doi:10.1038/cdd.2008.135.
- Micheau, O., S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, and J. Tschopp. 2001. NF- B Signals Induce the Expression of c-FLIP. *Molecular and Cellular Biology*. 21:5299–5305. doi:10.1128/MCB.21.16.5299.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D.W. Nicholson, C. Briand, and M.G. Grütter. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*. 277:45162–45171. doi:10.1074/jbc.M206882200.
- Oberst, A., C.P. Dillon, R. Weinlich, L.L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G.S. Salvesen, and D.R. Green. 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. 471:363–367. doi:10.1038/nature09852.
- Öztürk, S., K. Schleich, and I.N. Lavrik. 2012. Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): Fine-tuners of life and death decisions. *Experimental Cell Research*. 318:1324–1331. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.019.

- Panka, D.J., T. Mano, T. Suhara, K. Walsh, and J.W. Mier. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. 276:6893–6896. doi:10.1074/jbc.C000569200.
- Poukkula, M., A. Kaunisto, V. Hietakangas, K. Denessiouk, T. Katajamäki, M.S. Johnson, L. Sistonen, and J.E. Eriksson. 2005. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry*. 280:27345–27355. doi:10.1074/jbc.M504019200.
- Rasper, D.M., J.P. Vaillancourt, S. Hadano, V.M. Houtzager, I. Seiden, S.L. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B.F. Koop, E.P. Peterson, N. a Thornberry, J. Huang, D.P. MacPherson, S.C. Black, F. Hornung, M.J. Lenardo, M.R. Hayden, S. Roy, and D.W. Nicholson. 1998. Cell death attenuation by “Usurpin”, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell death and differentiation*. 5:271–288. doi:10.1038/sj.cdd.4400370.
- Ricci, M.S., Z. Jin, M. Dews, D. Yu, A. Thomas-Tikhonenko, D.T. Dicker, and W.S. El-Deiry. 2004. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Molecular and cellular biology*. 24:8541–8555. doi:10.1128/MCB.24.19.8541-8555.2004.
- Rushworth, S. a., A. Taylor, S. Langa, and D.J. MacEwan. 2008. TNF signaling gets FLIPped off: TNF-induced regulation of FLIP. *Cell Cycle*. 7:194–199. doi:10.4161/cc.7.2.5159.
- Safa, A.R. 2012. c-FLIP , a master anti-apoptotic regulator. *Experimental Oncology*. 2012:176–184.
- Sakamaki, K., M. Nozaki, K. Kominami, and Y. Satou. 2007. The evolutionary conservation of the core components necessary for the extrinsic apoptotic signaling pathway, in Medaka fish. *BMC genomics*. 8:141. doi:10.1186/1471-2164-8-141.
- Sakamaki, K., and Y. Satou. 2009. Caspases: Evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*. 74:727–753. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02184.x.
- Sakata, S.I., Y. Yan, Y. Satou, A. Momoi, P. Ngo-Hazelett, M. Nozaki, M. Furutani-Seiki, J.H. Postlethwait, S. Yonehara, and K. Sakamaki. 2007. Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene*. 396:134–148. doi:10.1016/j.gene.2007.03.010.
- Salon, C., B. Eymin, O. Micheau, L. Chaperot, J. Plumas, C. Brambilla, E. Brambilla, and S. Gazzeri. 2006. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell death and differentiation*. 13:260–272. doi:10.1038/sj.cdd.4401739.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 274:1541–1548. doi:10.1074/jbc.274.3.1541.
- Shi, B., T. Tran, R. Sobkoviak, and R.M. Pope. 2009. Activation-induced degradation of FLIPL is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 284:14513–14523. doi:10.1074/jbc.M807918200.
- Shirley, S., and O. Micheau. 2013. Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Letters*. 332:141–150. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.009.
- Shu, H.B., D.R. Halpin, and D. V. Goeddel. 1997. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*. 6:751–763. doi:10.1016/S1074-7613(00)80450-1.

- Silke, J., J. a Rickard, and M. Gerlic. 2015. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nature Immunology*. 16:689–697. doi:10.1038/ni.3206.
- Skurk, C., H. Maatz, H.S. Kim, J. Yang, R. Abid, W.C. Aird, and K. Walsh. 2004. The Akt-regulated Forkhead Transcription Factor FOXO3a Controls Endothelial Cell Viability through Modulation of the Caspase-8 Inhibitor FLIP. *Journal of Biological Chemistry*. 279:1513–1525. doi:10.1074/jbc.M304736200.
- Srinivasula, S.M., M. Ahmad, S. Otilie, F. Bullrich, S. Banks, Y. Wang, T. Fernandes-alnemri, C.M. Croce, G. Litwack, K.J. Tomaselli, R.C. Armstrong, and E.S. Alnemri. 1997. Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas / TNFR1-induced Apoptosis *. *Biochemistry*. 18542–18545. doi:10.1074/jbc.272.30.18542.
- Tait, S.W.G., and D.R. Green. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:621–632. doi:10.1038/nrm2952.
- Talbott, S.J., S. Luanpitpong, C. Stehlik, N. Azad, A.K. V Iyer, L. Wang, and Y. Rojanasakul. 2014. S-nitrosylation of FLICE inhibitory protein determines its interaction with RIP1 and activation of NF-κB. *Cell Cycle*. 13:1948–1957. doi:10.4161/cc.28898.
- Tenev, T., K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain, and P. Meier. 2011. The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. *Molecular Cell*. 43:432–448. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.006.
- Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J.L. Bodmer, M. Schröter, C. Scaffidi, P.H. Krammer, M.E. Peter, and J. Tschopp. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 386:517–521. doi:10.1038/386517a0.
- Tourian, L., H. Zhao, and C.B. Srikant. 2004. p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPs in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. *Journal of cell science*. 117:6459–6471. doi:10.1242/jcs.01573.
- Ueffing, N., E. Keil, C. Freund, R. Kühne, K. Schulze-Osthoff, and I. Schmitz. 2008. Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell death and differentiation*. 15:773–782. doi:10.1038/sj.cdd.4402314.
- Ueffing, N., M. Schuster, E. Keil, K. Schulze-osthoff, and I. Schmitz. 2010. Up-regulation of c-FLIPshort by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. *Blood*. 112:690–698. doi:10.1182/blood-2008-02-141382.
- Ueffing, N., K.K. Singh, A. Christians, C. Thorns, A.C. Feller, F. Nagl, F. Fend, S. Heikaus, A. Marx, R.B. Zotz, J. Brade, W. a. Schulz, K. Schulze-Osthoff, I. Schmitz, and C. Schwerk. 2009. A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. *Blood*. 114:572–579. doi:10.1182/blood-2009-02-204230.
- Vanlangenakker, N., M.J.M. Bertrand, P. Bogaert, P. Vandenabeele, and T. Vanden Berghe. 2011. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death and Disease*. 2:e230. doi:10.1038/cddis.2011.111.
- Vucic, D., V.M. Dixit, and I.E. Wertz. 2011. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:439–452. doi:10.1038/nrm3143.

- Wang, W., C.Z. Prince, Y. Mou, and M.J. Pollman. 2002. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 277:21723–21729. doi:10.1074/jbc.M202224200.
- Wilkie-Grantham, R.P., S.I. Matsuzawa, and J.C. Reed. 2013. Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. *Journal of Biological Chemistry*. 288:12777–12790. doi:10.1074/jbc.M112.431320.
- Xiao, C., B.F. Yang, J.H. Song, H. Schulman, L. Li, and C. Hao. 2005. Inhibition of CaMKII-mediated c-FLIP expression sensitizes malignant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*. 304:244–255. doi:10.1016/j.yexcr.2004.11.002.
- Yang, B.F., C. Xiao, H. Li, and S.J. Yang. 2007. Resistance to fas-mediated apoptosis in malignant tumours is rescued by KN-93 and cisplatin via downregulation of c-FLIP expression and phosphorylation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34:1245–1251. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04711.x.
- Yang, B.F., C. Xiao, W.H. Roa, P.H. Krammer, and C. Hao. 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278:7043–7050. doi:10.1074/jbc.M211278200.
- Youle, R.J., and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:47–59. doi:10.1038/nrm2308.
- Yu, J.W., P.D. Jeffrey, and Y. Shi. 2009. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:8169–74. doi:10.1073/pnas.0812453106.
- Yun, H., J. Xie, A.F. Olumi, R. Ghosh, and P. Addanki. 2015. Activation of AKR1C1 / ER β induces apoptosis by downregulation of c-FLIP in prostate cancer cells : A prospective therapeutic opportunity. *Oncotarget*. 6.
- Zhang, J., Y. Chen, Q. Huang, W. Cheng, Y. Kang, L. Shu, W. Yin, and Z.C. Hua. 2009. Nuclear localization of c-FLIP-L and its regulation of AP-1 activity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41:1678–1684. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.008.
- Zhang, J., Q. Wang, N. Zhu, M. Yu, B. Shen, J. Xiang, and a Lin. 2008. Cyclic AMP inhibits JNK activation by CREB-mediated induction of c-FLIP(L) and MKP-1, thereby antagonizing UV-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 15:1654–1662. doi:10.1038/cdd.2008.87.
- Zhang, X., L. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Otu, T. a. Libermann, W.C. DeWolf, R. Khosravi-Far, and A.F. Olumi. 2007. c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Research*. 67:9425–9434. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1310.